

Aus dem Max-Planck-Institut  
für physiologische und klinische Forschung  
W.G. Kerckhoff-Institut Bad Nauheim

Eingereicht über das Institut für Veterinär-Physiologie  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

# **Ontogenetische Veränderung des Plasmaleptinspiegels und seine Regulation bei 10 Tage alten Ratten**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
beim Fachbereich Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Eingereicht von  
Carmen Hufnagel

Gießen 2001



Aus dem Max-Planck-Institut  
für physiologische und klinische Forschung  
W.G. Kerckhoff-Institut Bad Nauheim  
Betreuerin: Prof. Dr. I. Schmidt

Eingereicht über das Institut für Veterinär-Physiologie  
der Justus-Liebig-Universität Gießen  
Betreuer: Prof. Dr. M. Diener

# **Ontogenetische Veränderung des Plasmaleptinspiegels und seine Regulation bei 10 Tage alten Ratten**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
beim Fachbereich Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Eingereicht von  
Carmen Hufnagel  
Tierärztin aus Duisburg

Gießen 2001

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: \_\_\_\_\_ Prof. Dr. B. Hoffmann \_\_\_\_\_

---

1. Berichterstatter: \_\_\_\_\_ Frau Prof. Dr. I. Schmidt \_\_\_\_\_

2. Berichterstatter: \_\_\_\_\_ Herr Prof. Dr. M. Diener \_\_\_\_\_

Tag der mündlichen Prüfung: \_\_\_\_\_ 24. Oktober 2001 \_\_\_\_\_

# Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis .....</b>	<b>I</b>
<b>Abkürzungen und Begriffe .....</b>	<b>VI</b>
<b>1. Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1. Adipositas - eine verbreitete Störung.....	1
1.2. Leptin, ein für die Regulation des Energiehaushaltes entscheidendes Hormon	2
1.2.1. Entdeckung .....	2
1.2.2. Funktion .....	2
1.2.3. Rezeptoren, Signaltransduktion und Wirkorte .....	3
1.2.4. Vorgänge, die den Plasmaleptinspiegel bestimmen .....	4
1.2.4.1. Leptinproduktion .....	5
1.2.4.2. Elimination .....	5
1.2.4.3. Fazit.....	6
1.2.5. Physiologische Regulation des Plasmaleptinspiegels.....	6
1.2.5.1. Beeinflussung durch den Körperfettgehalt.....	6
1.2.5.2. Beeinflussung durch den zellulären Stoffwechsel.....	7
1.2.5.3. Beeinflussung durch andere Hormonsysteme .....	7
1.2.5.4. Beeinflussung durch das sympathische Nervensystem.....	9
1.2.5.5. Rückwirkung von Leptin auf die eigene Produktion .....	10
1.2.5.6. Fazit.....	10
1.2.6. Resistenzbildung.....	11
1.2.7. Gendefekte im Leptinsystem.....	11
1.3. Besonderheiten der Regulation des Energiehaushaltes beim Jungtier.....	12
1.4. Ziele dieser Arbeit .....	15
<b>2. Material und Methoden .....</b>	<b>17</b>
2.1. Versuchsserien.....	17
2.2. Versuchstiere .....	21
2.2.1. Zucht .....	21
2.2.2. Tierhaltung .....	22
2.3. Präparationsmethoden.....	23
2.3.1. Tötung der Versuchstiere und Blutprobenentnahme .....	23
2.3.1.1. Feten.....	23

2.3.1.2.	Neugeborene.....	23
2.3.1.3.	1-5 Wochen alte Jungtiere.....	24
2.3.2.	Gewinnung von Blutplasma.....	24
2.3.3.	Entnahme von BAT und WAT bei 10 Tage alten Tieren .....	24
2.3.4.	Eviszeration zur Bestimmung der Körperzusammensetzung .....	25
2.4.	Analyseverfahren.....	25
2.4.1.	Physikalisch-chemische Bestimmung der Körperzusammensetzung.....	25
2.4.2.	Molekularbiologische Genotypbestimmung .....	27
2.4.2.1.	Isolierung der DNA aus Gewebeproben .....	27
2.4.2.2.	Polymerase-Kettenreaktion (PCR) .....	27
2.4.2.3.	Restriktionsverdau .....	28
2.4.2.4.	Elektrophorese.....	28
2.4.3.	Quantitative RT-PCR zur Bestimmung von mRNA-Konzentrationen .....	28
2.4.4.	Radioimmunoassay zur Bestimmung des Plasmaleptinspiegels.....	29
2.4.4.1.	Durchführung der Messung .....	29
2.4.4.2.	Berechnung des Plasmaleptingehaltes.....	31
2.4.4.3.	Intra- und Interassay-Variabilität .....	31
2.5.	Künstliche Aufzucht .....	32
2.5.1.	Versuchsaufbau .....	32
2.5.2.	Ernährung.....	33
2.5.3.	Temperaturmessung.....	35
2.5.4.	Sauerstoffmessung.....	35
2.5.4.1.	Meßsystem .....	35
2.5.4.2.	Kalibrierung .....	36
2.5.4.3.	Berechnung der Sauerstoffverbrauchswerte .....	36
2.5.5.	Überwachung der künstlichen Aufzucht.....	37
2.5.6.	Versuchsdurchführung.....	38
2.5.6.1.	Aufzucht unter moderater Kältebelastung .....	39
2.5.6.2.	Aufzucht unter thermoneutralen Bedingungen .....	39
2.5.6.3.	Aufzucht mit Noradrenalin-Behandlung .....	40
2.6.	Statistik .....	41
2.6.1.	Allgemeine Angaben zur statistischen Auswertung.....	41
2.6.2.	Zweifaktorielle Varianzanalysen.....	42
2.6.3.	Regressionsanalysen.....	42

2.6.3.1.	Lineare Regression.....	42
2.6.3.2.	Multiple Lineare Regression .....	42
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>44</b>
3.1.	Auswirkungen der Gendosis auf den perinatalen Plasmaleptinspiegel (Versuchsserie A) .....	44
3.1.1.	Plasmaleptinspiegel nach natürlicher Geburt .....	44
3.1.2.	Pränataler Plasmaleptinspiegel .....	45
3.2.	Methodische Untersuchungen an Wildtyp-Tieren (Versuchsserie B) .....	48
3.2.1.	Plasmaleptinspiegel zum Zeitpunkt des circadianen Minimums und Maximums des Kerntemperaturrhythmus von 10 Tage alten Tieren .....	48
3.2.2.	Entwicklungsbedingte Veränderungen der Körperzusammensetzung und des Plasmaleptinspiegels zwischen der 1. und 5. Lebenswoche .....	48
3.2.2.1.	Fettgehalt und Wassergehalt.....	49
3.2.2.2.	Feuchtmasse und FFDM .....	50
3.2.2.3.	Entwicklung des Körperfettgehaltes .....	50
3.2.2.4.	Entwicklung des Plasmaleptinspiegels .....	54
3.3.	Regulation des Plasmaleptinspiegels und der <i>Lep</i> -Expression im WAT und BAT (Versuchsserie C) .....	55
3.3.1.	Befunde bei normal aufgezogenen, unbehandelten Tieren .....	56
3.3.1.1.	Auswirkungen der Gendosis auf den Plasmaleptinspiegel und den Körperfettgehalt .....	56
3.3.1.2.	Auswirkungen der Gendosis auf die Leptin-mRNA-Konzentration im WAT und BAT .....	56
3.3.1.3.	Zusammenhang zwischen Plasmaleptinspiegel und der Leptin-mRNA-Konzentration im WAT und BAT .....	58
3.3.2.	Auswirkung von experimentellen Manipulationen der SAA und der Nettoenergiezufuhr auf den Plasmaleptinspiegel, den Körperfettgehalt und die Leptin-mRNA-Konzentration im BAT und WAT von künstlich aufgezogenen Tieren .....	59
3.3.2.1.	Manipulation der Aufzuchtbedingungen.....	59
3.3.2.2.	Unterschiede im Wachstum von normal und künstlich aufgezogenen Tieren	62
3.3.2.3.	Vergleich zwischen normal und künstlich unter moderater Kältebelastung aufgezogenen Tieren .....	64

3.3.2.4.	Einfluß der SAA und der Nettoenergiezufuhr auf die Plasmaleptinkonzentration und den Gesamtkörperfettgehalt.....	68
3.3.2.4.1.	Thermoneutrale Aufzucht .....	68
3.3.2.4.2.	Noradrenalin-Behandlung.....	69
3.3.2.5.	Einfluß der SAA und der Nettoenergiezufuhr auf die Leptin-mRNA-Konzentration im WAT.....	70
3.3.2.6.	Einfluß der SAA und der Nettoenergiezufuhr auf die Leptin-mRNA-Konzentration im BAT.....	71
3.3.3.	Regressionsanalysen zur Ermittlung des Zusammenhangs zwischen SAA, Körperfettgehalt, Plasmaleptinspiegel und Leptin-mRNA-Konzentration.....	72
3.3.3.1.	Einfluß der SAA auf den Zusammenhang zwischen Plasmaleptinkonzentration bzw. Leptin-mRNA-Konzentration im BAT und WAT und dem Gesamtkörperfettgehalt .....	72
3.3.3.2.	Abhängigkeit der Leptin-mRNA-Konzentration im BAT und WAT sowie des Plasmaleptinspiegels von der MS-MR .....	74
3.3.3.3.	Einfluß der Leptin-mRNA-Konzentration im WAT und BAT auf den Plasmaleptinspiegel .....	75
3.3.3.4.	Untersuchung der gegenseitigen Abhängigkeit von Plasmaleptinspiegel und Leptin-mRNA-Konzentration im WAT und BAT sowie deren Abhängigkeit von weiteren physiologischen Determinanten durch multiple Regressionsanalysen .....	79
3.3.3.4.1.	Abhängigkeit des Plasmaleptinspiegels von der Leptin-mRNA- Konzentration im WAT und BAT .....	79
3.3.3.4.2.	Abhängigkeit des Plasmaleptinspiegels von weiteren physiologischen Faktoren .....	80
3.3.3.4.3.	Abhängigkeit der Leptin-mRNA-Konzentration im WAT und BAT von verschiedenen physiologischen Variablen.....	81
3.3.3.4.4.	Einflußvariablen für die Körperfettmasse.....	82
<b>4.</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>83</b>
4.1.	Gendosis-Effekte auf den perinatalen Plasmaleptinspiegel .....	83
4.2.	Entwicklungsbedingte Veränderungen des Plasmaleptinspiegels und der Körperzusammensetzung bei Wildtyp-Tieren zwischen der 1. und 5. Lebenswoche .....	86
4.3.	Regulation des Plasmaleptinspiegels.....	87



4.3.1.	Veränderung von Gendosis-Effekten durch thermische und nutritive Manipulationen .....	87
4.3.1.1.	Methodische Erwägungen .....	87
4.3.1.2.	Effekte der SAA und unbekannter Faktoren .....	88
4.3.1.3.	Mögliche Ursachen für die hohen Plasmaleptinspiegel von <i>fa/fa</i> Tieren unter Kältebelastung .....	89
4.3.2.	Physiologische Kontrolle des Plasmaleptinspiegels .....	90
4.3.3.	<i>Lep</i> -Expression im BAT und WAT als Quelle für das Plasmaleptin .....	91
4.4.	Regulation der <i>Lep</i> -Expression im BAT .....	92
4.4.1.	Die SAA als dominierende Einflußgröße .....	92
4.4.2.	Methodische Erwägungen .....	93
4.5.	Regulation der <i>Lep</i> -Expression im WAT .....	94
4.5.1.	Die zellulären Energieströme als dominierender Faktor .....	94
4.5.2.	Methodische Erwägungen .....	95
4.6.	Vergleich der Wirkung von Änderungen der SAA auf die <i>Lep</i> -Expression im BAT und WAT .....	96
4.6.1.	Unterschiedliche Reaktionen von BAT und WAT .....	96
4.6.2.	Unterschiede im Fettstoffwechsel juveniler und adulter Tiere .....	98
4.7.	Die Rolle der LEPR-vermittelten Feedbackregulation bei der <i>Lep</i> -Expression im BAT und WAT .....	99
4.8.	Funktionelle Bedeutung des perinatalen und juvenilen Plasmaleptinspiegels .....	100
<b>5.</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>101</b>
<b>6.</b>	<b>Summary .....</b>	<b>104</b>
<b>7.</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>107</b>
<b>8.</b>	<b>Danksagung .....</b>	<b>128</b>

## Abkürzungen und Begriffe

$\alpha$ MSH	$\alpha$ -Melanozyten-stimulierendes Hormon
<i>ad libitum</i>	zur freien Verfügung
AGRP	„agouti-related-protein“
BAT	„brown adipose tissue“ - braunes Fettgewebe
BBB	„blood-brain-barrier“ - Blut-Hirn-Schranke
bp	Basenpaare
cAMP	zyklisches Adenosin-Monophosphat
CART	„cocaine and amphetamine regulated transcript“
d	Tag
<i>db</i>	„diabetic“, Bezeichnung für defektes Allel des Leptinrezeptorgens bei <i>?/db</i> Mäusen
DNA	Desoxyribonucleinsäure
dNTP-Mix	Desoxyribo-Nucleotid-Triphosphat-Mix
<i>fa</i>	„fatty“, Bezeichnung für defektes Allel des Leptinrezeptorgens bei <i>?/fa</i> Ratten
FFA	„free fatty acids“ – Freie Fettsäuren
FFDM	„fat-free dry-mass“ - fettfreie Trockenmasse
Gendosis	Anzahl der defekten Allele
h	Stunde
HSL	Hormon-Sensitive-Lipase
JAK	„janus kinase“
<i>Lep</i>	Leptin-Gen
<i>Lep</i> -Expression	Leptin-Gen-Expression
LEPR	Leptinrezeptor
<i>Lepr</i>	Leptinrezeptor-Gen

min	Minute
MR	Metabolische Rate
mRNA	„messenger ribonucleic acid“
MS-MR	Massenspezifische Metabolische Rate
MSP1	Restriktionsendonuklease
NPY	Neuropeptid Y
<i>ob</i>	“obese”, Bezeichnung für defektes Allel des Leptingens bei <i>ob</i> Mäusen
PCR	„polymerase chain reaction“ - Polymerase-Kettenreaktion
POMC	Proopiomelanocortin
RQ	Respiratorischer Quotient
s	Sekunde
SAA	sympatho-adrenerge Aktivität (experimentell induzierte Unterschiede in der Aktivität des SNS sowie pharmakologisch induzierte adrenerge Stimulation)
SEM	“standard error of the mean” - Standardfehler des Mittelwertes
SNS	sympathisches Nervensystem
STAT	„signal transducers and activators of transcription“
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
T <sub>c</sub>	Körperkerntemperatur
u	„unit“
UDP-GlcNAc	Uridindiphosphat-N-Acetylglucosamin
WAT	„white adipose tissue“ - weißes Fettgewebe
ZNS	zentrales Nervensystem
Σ	Summe



# 1. Einleitung

## 1.1. Adipositas - eine verbreitete Störung

Als Adipositas wird eine übermäßige Entwicklung des Körperfettgewebes bezeichnet, die über seinen normalen Anteil an der Körpermasse wesentlich hinausgeht. Unabhängig von der Genese der Adipositas ist sie energetisch das Ergebnis einer über längere Zeit bestehenden positiven Energiebilanz, das heißt, eines Überwiegens der Energiezufuhr durch die Nahrung über den Energieverbrauch. Charakteristischerweise treten bei der Adipositas, unabhängig von ihrer primären Ursache, eine Vielzahl von sekundären Veränderungen auf, die bewirken, daß sich der einmal erreichte Überschuß an Fettgewebe nur schwer rückgängig machen läßt.

Die Adipositas hat sich in den letzten Dekaden epidemisch bei Menschen und kleineren Haustieren vor allem in der westlichen Welt ausgebreitet (Friedman 2000, Kopelman 2000). Es ist bekannt, daß sie ein bedeutender Risikofaktor für die Gesundheit ist und unterschiedliche Folgeerkrankungen bedingen kann, wie z.B. Diabetes mellitus Typ 2, Herz-Kreislauferkrankungen, sowie das Risiko für Schlaganfälle und verschiedene Krebserkrankungen erhöht. Nicht zu unterschätzen sind auch mechanische Schäden durch das hohe Körpergewicht, das Muskeln, Knochen und Gelenke belastet sowie zu respiratorischen Problemen führen kann (WHO 1997, Kopelman 2000). Damit ist die Adipositas eine der bedeutendsten Krankheitsursachen in den westlichen Industriegesellschaften, und es besteht daher ein großes wissenschaftliches und pharmakologisches Interesse ihre Pathogenese aufzuklären. Die mögliche Entwicklung gezielt wirksamer Therapeutika findet in der Veterinär- und Humanmedizin ein breites Interesse und die Verhinderung von Sekundärerkrankungen der Adipositas würde gesundheitspolitisch hohe Behandlungssummen einsparen, ein Umstand, der in der heutigen Zeit immer mehr an Bedeutung gewinnt (Kopelman 2000).

Bei der Adipositas handelt es sich nicht um ein einheitliches Störungsbild, sondern die Ursachen sind multifaktoriell. Eine wesentliche Rolle spielt beim Auftreten von Adipositas vor allem die Interaktion verschiedener Umwelteinflüsse mit genetischen Veränderungen für Störungen in der Körpergewichts- bzw. Körperfettregulation (Kopelman 2000, Barsh et al. 2000). Besondere Bedeutung kommt dabei Ernährungsfehlern und Bewegungsmangel im heranreifenden oder erwachsenen Individuum zu (Kopelman 2000). Auch durch

hormonelle perinatale Veränderungen, z.B. induziert durch Gestationsdiabetes der Mutter, kann eine anhaltend erhöhte Adipositasdisposition im Individuum entstehen (Dörner und Plagemann 1994). Die Mechanismen der Körpergewichts- bzw. Körperfettregulation sind jedoch bis heute noch nicht vollständig geklärt. Ein wichtiger Schritt in ihrer Erforschung war 1994 die Entdeckung des Hormons Leptin (Zhang et al. 1994).

## **1.2. Leptin, ein für die Regulation des Energiehaushaltes entscheidendes Hormon**

### **1.2.1. Entdeckung**

Bereits 1953 vermutete Kennedy in seiner Lipostatischen Theorie der Energiebalance-Regulation einen im Blut zirkulierenden Faktor, der die Größe der Fettspeicher signalisiert und als Rückkopplungssignal für das Gehirn die Nahrungsaufnahme kontrolliert (Kennedy 1953). In den 70ern stellte Coleman aufgrund von Parabioseversuchen zwischen Mäusen mit genetisch bedingter Adipositas und nicht-adipösen, phänotypisch schlanken Partnern die Hypothese auf, daß die Fettsucht bei *ob/ob* Mäusen (*ob* = obese) dadurch bedingt sei, daß sie nicht in der Lage sind, einen Sättigungsfaktor zu produzieren, der die Futteraufnahme reguliert. Im Gegensatz dazu sollten *db/db* Mäuse (*db* = diabetes) den Sättigungsfaktor zwar produzieren, aber nicht auf ihn reagieren können und deshalb ebenfalls hyperphag sein (Coleman 1973). Diese Untersuchungen schufen die Voraussetzung für das Verständnis der Funktion der erst später entdeckten verantwortlichen Gene.

1994 gelang die Klonierung des *ob*-Gens<sup>1</sup> und die damit einhergehende Entdeckung eines vom weißen Fett gebildeten Botenstoffes, der später den Namen Leptin (gr. *leptos* = dünn) erhielt (Zhang et al. 1994, Halaas et al. 1995). 1995 konnte das Gen (*Lep*) für den zugehörige Leptinrezeptor (LEPR) identifiziert werden (Tartaglia et al. 1995). Durch die Entdeckung von Leptin und LEPR erhielt die Lipostatische Theorie eine molekulare Basis.

### **1.2.2. Funktion**

Die intensive Erforschung der Wirkmechanismen des Hormons Leptin innerhalb der letzten Jahre verdeutlichte, daß die Funktionen des Leptins weit über die eines

---

<sup>1</sup> *ob*-Gen = Leptin-Gen, im Folgenden als *Lep* abgekürzt

Sättigungsfaktors hinausgehen. Leptin spielt eine wichtige Rolle im Energiehaushalt, es reguliert den Körperfettgehalt, nicht nur indem es einen inhibitorischen Einfluß auf die Futteraufnahme ausübt, sondern auch indem es den Energieverbrauch moduliert. Neben dieser wichtigen Funktion hat Leptin noch viele weitere Wirkungen, die nicht mit der Regulation des Körperfettgehaltes in Verbindung stehen (Ahima and Flier 2000, Harris 2000, Trayhurn et al. 1999, Wauters et al. 2000). Leptin interagiert mit den bedeutendsten hormonellen Systemen des Körpers, wie den Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-, -Gonaden-, -Schilddrüsen-, sowie Wachstumshormon-Achsen, wobei der Wechselwirkung mit dem Hormon Insulin eine besondere Bedeutung zukommt (Wauters et al. 2000). Durch die hormonellen Interaktionen ist das Leptin z.B. in die sexuelle Reifung und in Reproduktionsfunktionen des Organismus involviert (siehe Harris 2000, siehe Ahima und Flier 2000) und vermittelt die komplexe Adaptation des Körpers an Hungerperioden (Flier 1998, Ahima und Flier 2000). Außerdem stimuliert es die Proliferation hämatopoetischer Stammzellen (Gainsford et al. 1996, Gainsford und Alexander 1999, Haluzik et al. 2000). Durch seine Wirkung nicht nur auf den Lipidstoffwechsel, sondern auch auf den Glucosestoffwechsel - z.B. inhibiert es wahrscheinlich die Insulinfreisetzung und erhöht die Glucoseutilisation (siehe Harris 2000, siehe Wauters et al. 2000, Kamohara et al. 1997) - ist es in der Lage, auf Metabolitenspiegel und -ströme einzuwirken (siehe Baile et al. 2000). Die Energieaustauschvorgänge, die an der Fettzelle ablaufen, werden aber nicht nur vom Leptin direkt und indirekt beeinflusst, sondern stellen zugleich wichtige Einflußgrößen für die Leptinproduktion dar.

### **1.2.3. Rezeptoren, Signaltransduktion und Wirkorte**

Leptin übt seine Wirkung über die Bindung an den LEPR aus. Der LEPR gehört zur Klasse 1 der Cytokine-Rezeptorfamilie. Es sind zur Zeit sechs Splicevarianten bekannt, die unterschiedliche Funktionen wahrnehmen (Lee et al. 1996, Chen et al. 1996, Chen et al. 1999, Wang et al. 1996). Nur die LEPR Rb-Form (lange Isoform aufgrund einer langen intrazellulären Domäne) ist aufgrund ihrer Struktur in der Lage die JAK (janus kinase)-STAT (signal transducers and activators of transcription) Signalkaskade zu aktivieren (Vaisse et al. 1996) und gilt als der hauptsächliche Vermittler der Leptinwirkung im Gehirn (Trayhurn et al. 1999). Andere Splicevarianten des Rezeptors mit einer kurzen intrazellulären Domäne agieren z.B. als Rezeptor im Gewebe (LEPR Ra) oder könnten als löslicher Rezeptor (LEPR Re) ohne intrazelluläre Domäne ein Transportprotein für Leptin im Plasma darstellen (Lee et al. 1996, Ahima und Flier 2000). Vom LEPR Ra wird

aufgrund seiner hohen Expression im Plexus choroideus auch angenommen, daß er für den Transport von Leptin in die oder aus der Cerebrospinalflüssigkeit zuständig ist und so die Blut-Liquor-Schranke überwunden wird (Ahima und Flier 2000, Bjorbaek et al. 1998). Die LEPR Rb-Form wird - in Übereinstimmung mit der führenden Rolle des ZNS in der Vermittlung der Leptineffekte - vor allem in hypothalamischen Regionen exprimiert, die essentiell sind für die Kontrolle der Energiebilanz durch Regulation der Futteraufnahme und des Energieverbrauchs (siehe Ahima und Flier 2000). Die höchste Dichte von Leptinrezeptoren findet sich im Nucleus arcuatus (Mercer et al. 1996 a, b, Guan et al. 1997, Elmquist et al. 1998). Die Leptinwirkung wird dabei über die Beeinflussung der Expression von verschiedenen katabol oder anabol wirkenden Neuropeptiden als Effektormoleküle vermittelt. Leptin inhibiert z.B. die Expression von NPY (Neuropeptid Y) oder AGRP (agouti-related-protein), die die Futteraufnahme stimulieren und den Energieverbrauch inhibieren. Andererseits stimuliert Leptin die Expression von POMC (Proopiomelanocortin), einem Vorläufer des katabolischen Peptids  $\alpha$ MSH (melanocyte stimulating hormone), und CART (cocaine and amphetamine regulated transcript), die hemmend auf die Futteraufnahme wirken und den Energieverbrauch stimulieren (Seeley und Schwartz 1999, Schwartz et al. 1999, Schwartz et al. 2000, siehe Baile et al. 2000). Der Transport des relativ großen Moleküls Leptin (16 kD) über die Blut-Hirn-Schranke (BBB, blood-brain-barrier) wird zum einen über ein spezifisches, sättigbares Transportsystem ermöglicht (Banks et al. 1996). Zum anderen gibt es mehrere Gebiete, wo die BBB durchlässiger ist als normal, z.B. Nucleus arcuatus, Eminentia mediana und Area postrema. Darüber hinaus wird LEPR Rb in geringer Dichte aber auch in vielen peripheren Geweben exprimiert, wie weißes Fettgewebe (WAT) und braunes Fettgewebe (BAT), Gonaden, Plazenta, Leber, Lunge, Skelettmuskel etc. (De Matteis et al. 1998), so daß neben der geschilderten zentral vermittelten Wirkung von Leptin auch periphere Wirkungen in Betracht zu ziehen sind.

#### **1.2.4. Vorgänge, die den Plasmaleptinspiegel bestimmen**

Der mit den herkömmlichen radioimmunologischen Methoden bestimmte Plasmaleptinspiegel gibt die Gesamtkonzentration des im Blutkreislauf frei (biologisch aktive Form) und an Transportproteine gebunden zirkulierenden Leptins wieder (Sinha et al. 1996 a, Pellemounter 1997, Landt 2000, Ahima und Flier 2000). Dabei wird die Höhe des Plasmaleptinspiegels sowohl von der Leptinproduktion als auch von seiner Elimination aus dem Blutkreislauf bestimmt.



#### 1.2.4.1. Leptinproduktion

Die Leptinproduktion erfolgt im adulten Tier vor allem im WAT. In früheren Stadien der Entwicklung (siehe 1.3.) konnte aber auch eine Leptin-mRNA-Bildung im BAT nachgewiesen werden (Dessolin et al. 1997). Auch beim adulten Tier gibt es Hinweise, daß Leptin-mRNA nicht nur im WAT, sondern auch in geringen, aber funktionell wirksamen Konzentrationen von einigen anderen Geweben und Organen gebildet wird, wie z.B. den Skelettmuskelzellen, der Mukosa des gastrischen Fundus, dem Milchdrüsenepithel und der Plazenta (Masuzaki et al. 1997, Bado et al. 1998, Morton et al. 1998, Wang et al. 1998). Außerdem konnte bei Mäusen, Ratten und beim Mensch nachgewiesen werden, daß regionsspezifische Unterschiede in der Leptin-mRNA-Konzentration in den verschiedenen weißen Fettdepots auftreten (Trayhurn et al. 1995 a, Ogawa et al. 1995, Rayner et al. 1997, Rousseau et al. 1997).

Die Produktion könnte auf verschiedenen Ebenen geregelt werden. Zum einen kann die Rate der Transkription des Leptingens (*Lep*) durch zahlreiche inhibierend oder stimulierend wirkende Transkriptionsfaktoren reguliert werden (Good 2000). Nach der Transkription wird die Menge und Funktionalität der neu synthetisierten mRNA durch verschiedene Mechanismen beeinflusst, wie dem Transport vom Kern ins Zytoplasma und der Stabilität der Leptin-mRNA im Zytoplasma. Ob solche Schritte auch bei der Regulation der Leptinproduktion eine Rolle spielen ist noch unklar. Auch zur Effizienz der Translation liegen bisher praktisch keine experimentellen Auskünfte vor. Es existieren jedoch Hinweise darauf, daß es in bestimmten Stoffwechsellagen, z.B. zu Beginn einer Fastenperiode, eine von der Leptin-mRNA-Konzentration unabhängige, geregelte Abnahme der Leptinproduktion gibt (Dallman et al. 1999). Diese könnte auf eine erniedrigte Translationsrate und/oder eine verringerte Leptinsekretion zurückzuführen sein. Bis jetzt ist noch unbekannt, ob und welche Schritte regulierend in die Kontrolle der Leptinsekretion eingreifen. Es gibt aber Anzeichen dafür, daß Leptin pulsatil von der Zelle ins Blut sezerniert wird (Sinha et al. 1996 b, Licinio et al. 1998).

#### 1.2.4.2. Elimination

Die Elimination, d.h. die Entfernung aus dem Blutplasma, erfolgt zum einen über die Einschleusung des Leptins in andere Gewebe (Extravasation), wie Gehirn, Jejunum, Leber, Magen und Lunge (Hill et al. 1998). Zum anderen erfolgt die Entfernung des Hormons

Leptin aus dem Körper über die glomeruläre Filtration der Nieren. Dabei wird Leptin unverändert ausgeschieden, ein Abbau von Leptin im Körper konnte bis jetzt nicht nachgewiesen werden. Bis heute konnte keine spezifische Kontrolle der renalen Leptinclearance nachgewiesen werden, sie scheint lediglich eine Funktion der Leptinkonzentration im Blut zu sein (Cumin et al. 1996, 1997).

#### **1.2.4.3. Fazit**

Für die Regulation des Plasmaleptinspiegels ist vor allem die Leptinproduktion wichtig, wobei die Plasmakonzentration nach dem heutigen Kenntnisstand relativ eng mit der mRNA-Konzentration im Fettgewebe zu korrelieren scheint. Dagegen geht man zur Zeit davon aus, daß die renale Elimination wahrscheinlich keinen wesentlichen regulatorischen Einfluß auf den Plasmaleptinspiegel ausübt. Inwieweit die Beziehung zwischen Leptin-mRNA-Konzentration und Plasmaleptinspiegel durch zusätzliche regulierende Schritte bei der Leptinproduktion und/oder Sekretion beeinflusst wird, ist noch unbekannt. Unklar ist bisher auch noch, inwieweit der Transport bzw. die Speicherung in anderen Gewebekompartimenten einen Einfluß auf die Höhe des Plasmaleptinspiegels hat. Dadurch ergeben sich Unsicherheitsfaktoren bei der Beurteilung des Zusammenhangs zwischen Plasma- und mRNA-Konzentration.

### **1.2.5. Physiologische Regulation des Plasmaleptinspiegels**

#### **1.2.5.1. Beeinflussung durch den Körperfettgehalt**

Bei Menschen und Nagetieren existiert normalerweise eine enge positive Korrelation zwischen der Leptin-mRNA-Konzentration sowie dem Plasmaleptinspiegel und dem Gesamtkörperfettgehalt (Maffei et al. 1995 a, b, Frederich et al. 1995, Considine et al. 1996, Considine und Caro 1997). Noch ist unklar, durch welche Kontrollmechanismen sich diese enge Korrelation ergibt, d.h. welche mit dem Gesamtkörperfettgehalt korrelierten physiologischen Signale die Regulation der *Lep*-Expression entsprechend regeln. Trotz der engen Korrelation zwischen *Lep*-Expression und Körperfettmasse ist noch nicht klar, ob die Konzentration von Triglyzeriden, anderen Lipidmetaboliten oder mechanische Faktoren, die in Beziehung zur Fettzellgröße stehen, die *Lep*-Expression bestimmen (Ahima and Flier 2000).

### 1.2.5.2. Beeinflussung durch den zellulären Stoffwechsel

Es gibt eindeutige Anzeichen dafür, daß Plasmaleptinspiegel und Leptin-mRNA-Konzentration auch unabhängig von Veränderungen der Körperfettmasse rasch auf andere metabolische Stimuli reagieren. Hier kommt den Komponenten des Energiestoffwechsels in den Zellen eine besondere Bedeutung zu, wobei nicht nur die Größe, sondern auch die Richtung der Metaboliten- bzw. Energieströme eine Rolle spielt. Eine Arbeitsgruppe konnte zeigen, daß Freie Fettsäuren (FFA), wie Palmitinsäure, in vitro die Leptin-mRNA-Konzentration von Rattenfettzellen erniedrigen (Shintani et al. 2000). Außerdem ist bekannt, daß sich der Plasmaleptinspiegel kurzfristig mit dem Ernährungsstatus verändert. Fasten über 24 h führt ohne bedeutende Änderung der Körperfettmasse zu einem starken Abfall des Plasmaleptinspiegels (Trayhurn et al. 1995 a). Bei *ad libitum* gefütterten Ratten erreicht der Plasmaleptinspiegel ca. 8 h nach Beginn der Nahrungsaufnahme sein Maximum (Saladin et al. 1995), d.h. zu einem Zeitpunkt, wo die Nährstoffe schon absorbiert wurden und im Körper weiterverarbeitet werden. Wang et al. (1998) konnten zeigen, daß der Glucosestoffwechsel ebenfalls eine wichtige regulatorische Funktion ausübt. Mit einer Erhöhung der Konzentration von UDP-N-Acetylglucosamin (UDP-GlcNAc), u.a. ein Endprodukt des Hexosemonophosphat-Weges im oxidativen Abbau der Glucose, steigen die *Lep*-Expression im Fettgewebe und im Skelettmuskel sowie der Plasmaleptinspiegel an. Hyperlipidämie und -glykämie führen zu einer Erhöhung des UDP-GlcNAc-Spiegels und haben somit denselben Effekt. Dies ist ein wichtiger Hinweis darauf, daß ein Anstieg der Verfügbarkeit von Energie in der Zelle, etwa in Verbindung mit einer gesteigerten zellulären Energieaufnahme, einen stimulierenden Einfluß auf die *Lep*-Expression hat.

### 1.2.5.3. Beeinflussung durch andere Hormonsysteme

Es existieren vielfältige Wechselwirkungen des Leptins mit anderen Hormonsystemen, die zum Teil noch einer genaueren Erforschung bedürfen. An dieser Stelle sollen kurz die wichtigsten Hormone erwähnt werden, die den Plasmaleptinspiegel beeinflussen.

#### **Insulin**

Besonders wichtig für den Energiestoffwechsel ist die Beziehung zwischen Leptin und Insulin, das eine wichtige Rolle im Glucosestoffwechsel spielt. Es besteht eine enge Korrelation zwischen Serumleptin- und Insulinspiegeln (Boden et al. 1997), welche sich

gegenseitig beeinflussen (siehe Wauters et al. 2000). In vitro stimuliert Insulin die *Lep*-Expression und Leptinsekretion isolierter Ratten- und menschlicher Fettzellen (Hardie et al. 1996 a, Kolaczynski et al. 1996, Rentsch und Chiesi 1996, Saladin et al. 1995, Wabitsch et al. 1996). Beim Nagetier induziert die Applikation von Insulin eine Erhöhung der *Lep*-Expression im Fettgewebe (Cusin et al. 1995, MacDougald et al. 1995, Saladin et al. 1995) und des Plasmaleptinspiegels (Hardie et al. 1996 b, Patel et al. 1998, Sivitz et al. 1998). Ratten, die durch Streptozotocin (STZ)-Behandlung Insulin-defizient sind, zeigen signifikant erniedrigte Leptinspiegel, nach Insulininjektion steigt ihre Leptinsekretion (MacDougald et al. 1995, Patel et al. 1998, Sivitz et al. 1998). Denselben Effekt hat eine Insulinbehandlung bei diabetischen Ratten, deren Plasmaleptinspiegel durch Insulindefizienz erniedrigt ist (Sivitz et al. 1998).

### **Sexualhormone**

In vitro zeigen weibliche Fettzellen eine höhere Leptin-mRNA-Sekretion als männliche Fettzellen (Casabiell et al. 1998). Auslöser für diesen Unterschied sind die Sexualhormone. Östrogen stimuliert die Leptinsekretion von Adipozyten in vitro nur bei weiblichen Fettzellen (Kristensen et al. 1999, Sivan et al. 1998). So zeigen ovariectomisierte Ratten in vivo erniedrigte Plasmaleptinspiegel, die durch Östradiolgabe wieder normalisiert werden können (Kristensen et al. 1999, Shimizu et al. 1997). Androgene, wie Testosteron wirken inhibitorisch auf die *Lep*-Expression und Sekretion von menschlichen Zellen in vitro (Wabitsch et al. 1997). Bei Ratten konnte in vivo nach Androgenapplikation eine verminderte *Lep*-Expression beobachtet werden, es kam aber trotzdem nicht zu Veränderungen im Plasmaleptinspiegel (Wu-Peng et al. 1999). Leptin und Testosteron sind bei Männchen offensichtlich invers korreliert (Garcia-Mayor et al. 1997, Wabitsch et al. 1997, Behre et al. 1997, Haffner et al. 1997, Janssen et al. 1998). Bei chronischen Hungerzuständen kommt es durch die suppressive Wirkung von Leptin auf die weiblichen Sexualhormone zu einem Ausfall der Ovulation (Ahima et al. 1996).

### **Glucocorticoide**

Glucocorticoide sind ebenfalls potente Regulatoren der *Lep*-Expression (Wauters et al. 2000). In vitro üben Glucocorticoide einen stimulierenden Effekt auf die Leptinsynthese und –sekretion von isolierten Fettzellen aus (Wabitsch et al. 1996, Hardie et al. 1996 a, Murakami et al. 1995, Slieker et al. 1996). Es konnte gezeigt werden, daß Cortisol die Leptinproduktion auch in vivo stimuliert (Wauters et al. 2000). In Übereinstimmung damit

induziert die periphere Glucocorticoidinfusion bei der Ratte die *Lep*-Expression im Fettgewebe und erzeugt eine Hyperleptinämie (De Vos et al. 1995, Zakrzewska et al. 1999).

#### 1.2.5.4. Beeinflussung durch das sympathische Nervensystem

Die Aktivität des sympathischen Nervensystems (SNS) spielt eine wesentliche Rolle für die Regulation der Leptinspiegel durch Hemmung der *Lep*-Expression im Fettgewebe. Neben dem starken direkten Einfluß durch die sympathische Innervation von BAT und WAT könnten außerdem auch indirekte Einflüsse des SNS durch die Freisetzung von Katecholaminen aus den Nebennieren hierzu beitragen (Trayhurn et al. 1998). Katecholamine wirken auf die Fettzellen vor allem über  $\beta_3$ -Adrenorezeptoren, die der dort vorherrschende Subtyp der Adrenorezeptoren sind (Giacobino 1995). In vivo inhibieren Katecholamine (Trayhurn et al. 1995 b) oder  $\beta_3$ -Adrenorezeptor-Agonisten (Moinat et al. 1995, Gettys et al. 1996, Mantzoros et al. 1996, Slieker et al. 1996, Trayhurn et al. 1996, Dessolin et al. 1997) die *Lep*-Expression im WAT und erniedrigen den Plasmaleptinspiegel bei Nagern. Auch im BAT konnte dieselbe inhibierende Wirkung auf die *Lep*-Expression nachgewiesen werden (Moinat et al. 1995, Deng et al. 1997). Versuche in Zellkulturen bestätigten diese Wirkung von Katecholaminen und  $\beta$ -Agonisten (Gettys et al. 1996, Hardie et al. 1996 b, Dessolin et al. 1997, Mitchell et al. 1997).

Es ist jedoch nicht klar, ob die Katecholamine direkt oder indirekt auf die *Lep*-Expression wirken. Zum einen wird angenommen, daß die *Lep*-Expression im WAT und BAT direkt über die Stimulation der Adrenorezeptoren und die Synthese von cAMP als Second-Messenger-System inhibiert wird (Kosaki et al. 1996, Slieker et al. 1996, Deng et al. 1997). Diese Suppression könnte z.B. über eine Veränderung der Gentranskription oder eine Verkürzung der Halbwertszeit der Leptin-mRNA erfolgen (Deng et al. 1997). Zum anderen könnte ein indirekter Einfluß über Veränderungen im Fettzellstoffwechsel, wie der Erhöhung der Konzentration von Stoffwechselmetaboliten, z.B. FFA (Shintani et al. 2000), oder über Veränderungen der zellulären Energieströme ausgeübt werden, die ebenfalls durch die adrenerge Stimulation verändert werden. Die adrenerge Stimulation steigert einerseits die Lipolyse, d.h. die Freisetzung von Fettsäuren in den Fettzellen, indem über eine Erhöhung der cAMP-Konzentration, die die Proteinkinase A aktiviert, die Triacylglycerinlipase (Synonym: Hormon-sensitive-Lipase; HSL) (Carey 1998) als geschwindigkeitslimitierendes Enzym aktiviert wird (Berraondo und Martinez 2000,

Sztalryd und Kraemer 1994). Zudem wird im BAT durch sympathische Stimulation die thermoregulatorische Thermogenese gesteigert, indem durch die Entkopplung des Protonentransports in den Mitochondrien bei der Oxidation von Fettsäuren Wärme freigesetzt und damit die zelluläre Energieabgabe erhöht wird (Nedergaard und Cannon 1998, Giacobino 1995). Gleichzeitig inhibiert Noradrenalin im WAT die Lipoprotein-Lipase (LPL)-Aktivität und stimuliert diese im BAT (Trayhurn et al. 1995 b) und verändert somit auch den Einstrom von FFA in die Zellen, da die LPL das geschwindigkeitsbestimmende Enzym für die Aufnahme von Lipoproteinen aus der Zirkulation ist (Eckel 1989).

#### **1.2.5.5. Rückwirkung von Leptin auf die eigene Produktion**

Es besteht außerdem eine negative Rückkopplung von Leptin auf die eigene Produktion (Wang et al. 1999). Dieser Feedbackmechanismus könnte zum einen peripher, d.h. autokrin über LEPR auf den Fettzellen erfolgen (Zhang et al. 1997, Wang et al. 1999). So gibt es Hinweise, daß Leptin seine eigene mRNA-Expression in vitro inhibieren könnte (Zhou et al. 1997). Andere Autoren finden jedoch keinen Hinweis auf einen solchen lokalen Effekt im Fettgewebe und äußern die Vermutung, daß der in vivo beobachtete Feedbackmechanismus z.B. zentral über die Leptinrezeptoren im Hypothalamus und vermittelt durch das SNS erfolgen könnte (Sliker et al. 1996). Entsprechend den oben erläuterten Vorstellungen könnte auch diese Wirkung von Leptin auf seine eigene Expression sowohl bei Beteiligung lokaler wie zentraler LEPR entweder direkt über das JAK-STAT-System oder indirekt über die Beeinflussung des zellulären Fettstoffwechsels, z.B. einen Anstieg der FFA, erfolgen (Wang et al. 1999).

#### **1.2.5.6. Fazit**

Angesichts der dargestellten (und vielfältiger noch genauer zu erforschender) Kurzzeitänderungen und Wechselwirkungen mit anderen Hormonsystemen erscheint die bekannte Korrelation zwischen Fettmasse und Plasmaleptinspiegel erstaunlich. Die Untersuchung der Zusammenhänge zwischen Körperfettmasse und Plasmaleptinspiegel ist die Voraussetzung für das Verständnis der Funktion des Leptins als Signal für den Körperfettgehalt.

### 1.2.6. Resistenzbildung

Bei allen adipösen Tieren, mit Ausnahme der *ob/ob* Maus, die kein funktionelles Leptin besitzt, sind die Plasmaleptinspiegel und die *Lep*-Expression erhöht, unabhängig davon aufgrund welcher Ursachen oder Störungen sich die Adipositas entwickelt hat (Frederich et al. 1995, Maffei et al. 1995 a), wobei sowohl freie wie gebundene Leptinfraktionen erhöht sind (McConway et al. 2000, Lahlou et al. 2000). Dies läßt darauf schließen, daß sich bei adipösen Nagern und Menschen eine Leptinresistenz entwickelt. Diese könnte auf verschiedenen Ebenen des Leptin-Feedbackmechanismus auftreten, z.B. durch einen eingeschränkten Transport des Leptins über die BBB, durch Veränderungen auf der Ebene des Rezeptors oder der Signaltransduktion und durch Veränderungen in den vermittelnden effektorischen Systemen (siehe Wauters et al. 2000).

### 1.2.7. Gendefekte im Leptinsystem

Wie man bereits früher aufgrund von Parabioseversuchen bei *db/db*-Mäusen (Coleman 1973, Coleman und Hummel 1969) und *fa/fa* Ratten (*fa* = fatty; Harris et al. 1987) vermutet hat, beruht die Adipositas bei diesen Nagetiermodellen auf einer Mutation im Leptinrezeptor-Gen (Chua et al. 1996, Lee et al. 1996, Phillips et al. 1996), im Gegensatz zu *ob/ob* Mäusen, denen funktionelles Leptin fehlt. Die „fatty“- Mutation ist eine Punktmutation im *Lep<sup>r</sup>*<sup>2</sup>, die dazu führt, daß in der extrazellulären Domäne, die allen bekannten Spliceformen von LEPR gemeinsam ist (Ahima und Flier 2000, Wang et al. 1998), die Aminosäure Glutamin durch Prolin ausgetauscht wird (Chua et al. 1996). Durch die Mutation kommt es zu einer reduzierten Expression des LEPR-Moleküls (Crouse et al. 1998, da Silva et al. 1998), und es konnte gezeigt werden, daß die totale hypothalamische Leptinbindung in Abhängigkeit von der Gendosis sinkt (Schmidt et al. 2000). Während der intakte LEPR vermutlich verschiedene STAT-Proteine über den JAK/STAT-Mechanismus aktivieren kann (Vaisse et al. 1996, McCowen et al. 1998), zeigten Untersuchungen an Zellkulturen eine reduzierte, jedoch nicht vollständig unterbrochene Signalübertragung bei Mutation des LEPR (White et al. 1997, da Silva et al. 1998). In vivo führt die homozygote Mutation hingegen unter physiologischen Bedingungen zu einem völligen Verlust der

---

<sup>2</sup> Das Leptinrezeptor-Gen (*Lep<sup>r</sup>*) kommt in zwei allelen Formen vor. *Lep<sup>r</sup><sup>fa</sup>* steht für das defekte Allel bei hetero- (+/*fa*) und homozygoten (*fa/fa*) Trägern der Mutation. In Anlehnung an die englische Ausdrucksweise wurden in dieser Arbeit die Auswirkungen des Gendefektes in Abhängigkeit von der Anzahl der defekten Allele (0,1,2) als „Gendosis“-abhängige Effekte bezeichnet.

Reaktion auf exogen zugeführtes rekombinantes Leptin (Stehling et al. 1997, Kraeft et al. 1999). Periphere Leptininjektionen bei *fa/fa* Tieren lösen keinen Effekt aus (Dryden et al. 1999), nur mit intraventriculärer Leptininjektion in unphysiologischen Dosen ist eine Wirkung auslösbar (Dryden et al. 1999). Durch diesen genetischen Defekt ist dieses Tiermodell hervorragend geeignet, um die Funktion des LEPR zu studieren.

In Abhängigkeit von der Gendosis kommt es zu einem unterschiedlichen Anstieg des Körperfettgehaltes bereits in der ersten Lebenswoche (Meierfrankenfeld et al. 1996, Schwarzer et al. 1997). Vor der Entwicklung dieses von der Gendosis abhängigen Unterschiedes im Körperfettgehalt konnten bisher keine Abnormitäten gängiger Stoffwechselfparameter gefunden werden. So differieren weder fetale noch neonatale Plasmainsulinkonzentration und Leberglykogengehalt zwischen *+fa* und *fa/fa* Wurfgeschwistern. Zudem konnten zwischen 24 h alten *+fa* und *fa/fa* Welpen ebenfalls keine Unterschiede im Körperfettgehalt oder im Triglyzeridgehalt im BAT, WAT und in der Leber festgestellt werden (Meierfrankenfeld et al. 1996). Ein quantitativer Vergleich der Plasmaleptinkonzentration und der Gesamtkörperfettmasse von 10 Tage alten Zuckerratten demonstrierte aber, daß der Anstieg der Plasmaleptinkonzentration von *fa/fa* und *+fa* Tieren im Vergleich zu Wildtyp-Welpen (*+/+*) nicht allein auf ihren Anstieg im Körperfettgehalt zurückzuführen ist (Zhang et al. 1997). Dies läßt vermuten, daß die *Lep*-Expression im Fettgewebe und die Plasmaleptinkonzentration einer negativen Feedbackregulation unterliegen, welche durch den LEPR vermittelt wird. Diese Gendosis-abhängigen Effekte treten vor Ausprägung von Unterschieden in der Plasmainsulinkonzentration auf und könnten durch autokrine und/oder ZNS-vermittelte Effekte der Leptinwirkung zustande kommen (Zhang et al. 1997).

### **1.3. Besonderheiten der Regulation des Energiehaushaltes beim Jungtier**

Da entscheidende Schritte der neuronalen Entwicklung der Ratte postnatal stattfinden (Sherwood und Timiras 1970, Romijn et al. 1991), kann bei Ratten die Reifung komplexer Regelvorgänge experimentell verfolgt werden. Zudem lassen sich im Jungtier die Entwicklungen von Störungen in solchen Regelsystemen untersuchen, bevor sekundäre Überlagerungen stattgefunden haben. Dabei müssen aber die physiologischen Besonderheiten der Jungtiere gegenüber den adulten Tieren berücksichtigt werden.



Ratten werden mit fast leeren Triglyzeridspeichern im WAT und BAT geboren (Pequignot-Planche et al. 1977, Ricquier und Hemon 1976). Trotz der geringen Triglyzeridmenge von 0,2 mg im makroskopisch fast unsichtbaren inguinalen WAT-Polster (Pequignot-Planche et al. 1977) und ca. 1 mg im interscapulären BAT (Ricquier und Hemon 1976) sowie einem Gesamtkörperfettgehalt von weniger als 50 mg (Meierfrankenfeld et al. 1996), ist bereits ein meßbarer Plasmaleptinspiegel vorhanden (Dessolin et al. 1997). Nach dem ersten Säugen setzt die Triglyzeridspeicherung in die Fettspeicher ein (Taylor 1960) und bereits 12 h nach der Geburt sind die WAT-Polster auch makroskopisch sichtbar und der Triglyzeridgehalt des BAT hat sich verfünffacht (Pequignot-Planche et al. 1977, Ricquier und Hemon 1976). Im Jungtier ist der mengenmäßige Anteil vom BAT an der Gesamtkörperfettmasse im Vergleich zum WAT viel größer als beim Adulten (Dessolin et al. 1997, Rayner et al. 1997). Ebenso ist die *Lep*-Expression im BAT von Neugeborenen und Saugwelpen viel stärker ausgeprägt als beim Adulten (Devaskar et al. 1997), bei dem sie kaum nachweisbar ist (Cinti et al. 1997, Moinat et al. 1995), wobei über die Regulation der *Lep*-Expression im thermogenetisch hochaktiven BAT des Jungtieres bisher noch keine Informationen vorliegen. Außerdem ist bekannt, daß sich in diesem Alter die *Lep*-Expression im WAT fast ausschließlich auf das in diesem Alter gut entwickelte subcutane Fettpolster konzentriert, während die viszerale Depots noch sehr klein sind (Rayner et al. 1997). Die Beschränkung auf im wesentlichen nur zwei physiologisch gut charakterisierte Fettgewebstypen, BAT und subcutanes WAT, die an der Leptinbildung beteiligt sind, vereinfacht es, im Jungtier modellhaft das Zusammenspiel der Regulation der *Lep*-Expression an verschiedenen Bildungsorten und ihrer jeweiligen Beiträge zum zirkulierenden Leptinspiegel zu untersuchen. Dies gilt insbesondere, da sich in diesem Alter eine äußerst enge Korrelation zwischen Plasmaleptinspiegel und Körperfettgehalt nachweisen läßt (Eiden et al. 2001).

Die Ernährung der Jungtiere unterscheidet sich von der Zusammensetzung des Standardfutters für adulte Ratten vor allem durch den hohen Fettanteil, der ca. 70% der aufgenommenen Kalorien ausmacht, und den geringen Anteil von Kohlenhydraten (Wells 1985). Die enzymatische Ausstattung für nutritive Stoffwechselvorgänge bei Ratten im Säuglingsalter differiert ebenfalls erheblich von der der adulten Tiere (siehe Henning 1981). Der Magen ist unter physiologischen Bedingungen ständig mit Milch gefüllt, so daß sich die Jungtiere kontinuierlich in der Resorptionsphase befinden. Durch die linguale Lipase wird die Fettverdauung im Magen eingeleitet und die Saugwelpen sind in der Lage

mittelkettige FFA direkt aus dem Magen zu absorbieren (Hamosh 1979, Aw und Grigor 1980, Fernando-Warnakulasurya et al. 1981). Die unter physiologischen Bedingungen ständig hohe Verfügbarkeit von FFA und Triglyzeriden im Blut (Page et al. 1971, Foster und Bailey 1976, Robles-Valdes et al. 1976) führt zu einem dazu, daß die Fetteinlagerung auf den mit der Milch aufgenommenen Fetten beruht, während im Gegensatz zum adulten Tier die Synthese von Fettsäuren oder die Lipolyse quantitativ noch keine Rolle für den Fettstoffwechsel spielen (Taylor et al. 1967, Benito et al. 1979, Tsujikawa und Kimura 1980, Pillay und Bailey 1982, siehe Ferre et al. 1986). Außerdem kommt es zusammen mit der hohen oxidativen Kapazität der Leber zu einer lebhaften Produktion von Ketonkörpern (Lockwood und Bailey 1971, Foster und Bailey 1976), vor allem Acetoacetat u. in 3-fach höherer Konzentration  $\beta$ -Hydroxybutyrat. Diese dienen dem Gehirn und vielen Geweben bzw. Stoffwechselvorgängen als vorrangiges Substrat zur Deckung des Energiebedarfs (Williamson und Buckley 1973, Robinson und Williamson 1980). Der verbleibende Bedarf an Glucose wird fast ausschließlich durch Gluconeogenese gedeckt (Ferre et al. 1986), während Glycogenolyse kaum stattfindet (siehe Ferre et al. 1986). Bei Ratten im Säuglingsalter besteht im Vergleich zur adulten Ratte zudem eine Insulinresistenz (Issad et al. 1987, 1989).

Bereits innerhalb der 1. Lebenswoche ist ein pränatal durch das Muttertier synchronisierter, juveniler Tagesrhythmus der Körperkerntemperatur ( $T_c$ ) bei normalen Aufzuchtbedingungen nachweisbar, der in der Mitte der zweiten Lebenswoche am stärksten ausgeprägt ist (Nuesslein und Schmidt 1990) und in der 3. Lebenswoche allmählich ausläuft, bevor die Entwicklung des adulten  $T_c$ -Rhythmus während des 2. Lebensmonates beginnt (Nüßlein 1992). Der ausgeprägte juvenile Tagesrhythmus hat erhebliche Auswirkungen auf viele metabolische Größen, jedoch ist die Konzentration von für den Energiestoffwechsel wesentlichen Substanzen, wie Glucose und  $\beta$ -Hydroxybutyrat oder auch Insulin, im Blutplasma von künstlich aufgezogenen Ratten im circadianen Minimum und Maximum des  $T_c$ -Rhythmus gleich hoch (Nüßlein 1992). Der juvenile Tagesrhythmus unterscheidet sich vom adulten Tagesrhythmus vor allem darin, daß er nur unter Kältebelastung auftritt und seine Amplitude mit sinkender Umgebungstemperatur größer wird, wobei die Absenkungen von  $T_c$  und Metabolischer Rate (MR) so groß werden können, daß sich eine Ähnlichkeit zum „Daily Torpor“ ergibt, wie er bei vielen adulten kleinen (<50 g) Säugetieren auftritt und der durch ein Absinken der Körpertemperatur und des Energieverbrauchs in der Inaktivitätsphase weit unter das normale Ruhenniveau

gekennzeichnet ist (Geiser 1988, Nüßlein 1992). Der juvenile Tc-Rhythmus beruht auf einer tageszeitlich unterschiedlichen sympathischen Aktivierung der thermoregulatorischen Wärmeproduktion im BAT (Redlin et al. 1992), wobei das Minimum des Tagesganges zu Beginn der Lichtphase erreicht wird (Nüßlein 1992). Dieser Tagesgang bleibt auch während Isolation und künstlicher Aufzucht im Dauerlicht erhalten (Nüßlein 1992). Dagegen zeigen thermoneutral gehaltene Jungtiere weder in der Tc noch in der Stoffwechselrate eine Tagesperiodik (Nuesslein-Hildesheim und Schmidt 1994).

Für viele Untersuchungen an Jungtieren hat sich die künstliche Aufzucht bewährt. Sie erlaubt eine exakte Kontrolle und Variation der Umweltbedingungen, wie z.B. der Menge und Art der zugeführten Nahrung und der Umgebungstemperatur. Außerdem ist eine kontinuierliche Langzeit-Aufzeichnung wichtiger Meßgrößen, wie Sauerstoffverbrauch und Körperkerntemperatur, möglich. Beachtet werden muß, daß eine künstliche Ernährung mit der üblicherweise verwendeten Ersatzmilch nach Messer (1969) die Nährstoffkonzentration im Blut der Jungtiere verändert, z.B. kommt es durch einen geringeren Anteil mittelkettiger Fettsäuren zu einer erniedrigten  $\beta$ -Hydroxybutyrat-Konzentration im Blut (Sonnenberg et. al. 1982). Zudem treten viele weitere Unterschiede zwischen normal und künstlich aufgezogenen Jungtieren auf, so daß ein direkter Vergleich zwischen normal und künstlich aufgezogenen Tieren nicht sinnvoll ist.

#### **1.4. Ziele dieser Arbeit**

Hauptziel dieser Arbeit war die Untersuchung der entwicklungsbedingten Veränderungen des Plasmaleptinspiegels bei Ratten im Säuglingsalter und der der Regulation des Plasmaleptinspiegels zugrunde liegenden physiologischen Kontrollvorgänge. Da in früheren Untersuchungen gezeigt werden konnte, daß die erhöhte Plasmaleptinkonzentration von 10 Tage alten *fa/fa* und *+fa* Tieren im Vergleich zu *+/+* Welpen nicht allein auf ihren größeren Körperfettgehalt zurückzuführen ist (Zhang et al. 1997), wurde in der vorliegenden Arbeit die Auswirkung der Gendosis des LEPR auf die Kontrolle des perinatalen Plasmaleptinspiegels bei Ratten durch die Untersuchung von Tieren mit intaktem (*+/+*) und genetisch defektem (*+fa* und *fa/fa*) LEPR perinatal vor dem Beginn der Triglyzeridspeicherung analysiert.

Vor weiterführenden Untersuchungen zum Einfluß der Gendosis auf den Plasmaleptinspiegel von 10 Tage alten Jungtieren wurden methodische Untersuchungen

zur Charakterisierung des Plasmaleptinspiegels an Wildtyp-Welpen durchgeführt. Zum einen mußte geklärt werden, ob der zu diesem Zeitpunkt ausgeprägte Tc-Rhythmus einen Einfluß auf die Bestimmung des Plasmaleptinspiegels hat. Deshalb wurde der Plasmaleptinspiegel bei 10 Tage alten Ratten zum Zeitpunkt des circadianen Minimums und Maximums des Tc-Rhythmus verglichen. Eingehend wurde desweiteren der Zusammenhang zwischen Veränderungen der Körperzusammensetzung und des Plasmaleptinspiegels zwischen der 1. und 5. Lebenswoche analysiert, um zu klären, ob und gegebenenfalls wann die bei Mäusen in der zweiten postnatalen Lebenswoche nachgewiesene “Leptinsurge”, ein 5-10 facher Anstieg des Plasmaleptinspiegels unabhängig von Veränderungen der Körperfettmasse (Ahima et al. 1998), auch bei Ratten im Säuglingsalter auftritt.

Aufgrund der Voruntersuchungen erschienen 10 Tage alte Ratten besonders geeignet, um die Rolle der sympatho-adrenergen Aktivität (SAA)<sup>3</sup> sowie der zellulären Energieströme und/oder der Energiespeicherung bei der Vermittlung der Feedbackregulation von Leptin auf seine eigene Expression in Fettzellen zu untersuchen. Deshalb analysierten wir in diesem Alter die Effekte der Gendosis und von experimentell induzierten Unterschieden in der SAA, der akuten Nettoenergiezufuhr<sup>4</sup> und des Körperfettgehaltes auf die Leptin-mRNA-Konzentration im BAT und WAT<sup>5</sup> sowie auf die Plasmaleptinkonzentration. Hierzu wurden zunächst Vergleichsdaten unter normalen Aufzuchtbedingungen im Nest, d.h. bei moderater Kältebelastung, erhoben. Danach wurden die Daten von unter ähnlichen thermischen Bedingungen künstlich aufgezogenen Tieren mit denen unter veränderten thermischen und nutritiven Bedingungen künstlich aufgezogenen Tieren verglichen.

---

<sup>3</sup> Der Ausdruck SAA wird in dieser Arbeit verwendet, um die Effekte von experimentell induzierten Unterschieden in der Aktivität des SNS sowie pharmakologisch induzierter adrenerger Stimulation zusammenzufassen

<sup>4</sup> Nettoenergiezufuhr = Differenz zwischen der mit der Milch zugeführten Energie und der verbrauchten Energie in kJ

<sup>5</sup> in Kooperation mit Yiyang Zhang und Rudi Leibel, New York

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Versuchsserien

Zur Untersuchung der physiologischen Kontrolle des Plasmaleptinspiegels bei Ratten im Säuglingsalter wurden 3 Versuchsserien durchgeführt:

- A) Ermittlung der Auswirkungen des Leptinrezeptors auf die Kontrolle des perinatalen Plasmaleptinspiegels durch Untersuchung von Ratten mit intaktem (+/+) Leptinrezeptor und solchen, die hetero- (+/fa) oder homozygot (fa/fa) für den Leptinrezeptordefekt sind
- 10 min nach natürlicher Geburt
  - ca. 4 h vor dem errechneten Geburtstermin (Kaiserschnitt)
  - ca. 24 h vor dem errechneten Geburtstermin (Kaiserschnitt)
- B) Methodische Voruntersuchungen für die experimentelle Analyse der Kontrolle des Plasmaleptinspiegels an Wildtyp-Ratten zwischen der 1. und 5. Lebenswoche
- Untersuchung des Plasmaleptinspiegels zum Zeitpunkt des circadianen Minimums und Maximums des Tc-Rhythmus von 10 Tage alten Tieren
  - Zusammenhang zwischen entwicklungsbedingten Veränderungen des Körperfettgehaltes und des Plasmaleptinspiegels zwischen der 1. und 5. Lebenswoche
- C) Experimentelle Analyse der direkten und indirekten Feedbackkontrolle des Plasmaleptinspiegels und der *Lep*-Expression im BAT und WAT von 10 Tage alten +/+, +/fa und fa/fa Ratten durch Untersuchungen an normal, d.h. durch die Mutter, aufgezogenen Tieren und an Tieren, deren SAA und Nettoenergiezufuhr während künstlicher Aufzucht manipuliert wurden

- Erhebung von Vergleichsdaten an normal aufgezogenen Tieren
- Untersuchungen an künstlich aufgezogenen Tieren unter folgenden Bedingungen:
  - ◇ Moderate Kältebelastung von Tag 8-10
  - ◇ Thermoneutrale Bedingungen von Tag 8-10
  - ◇ Thermoneutrale Bedingungen von Tag 4-10/11
  - ◇ Noradrenalin-Behandlung unter thermoneutralen Bedingungen von Tag 4-10/11, wobei die Milchzufuhr so an den Verbrauch angepaßt wurde, daß eine normale Einlagerung von Körperfett aufrecht erhalten wurde
  - ◇ Noradrenalin-Behandlung unter thermoneutralen Bedingungen von Tag 4-10/11, wobei die Milchzufuhr so an den Verbrauch angepaßt wurde, daß die Einlagerung von Körperfett erniedrigt war

Eine Übersicht über die Anzahl der in den Versuchsserien A und B verwendeten Versuchstiere und deren Genotypverteilung gibt Tabelle I. Da in Versuchsserie C nicht bei allen Tieren sowohl Plasmaleptinspiegel und Körperzusammensetzung wie auch die Leptin-mRNA-Konzentration im WAT und BAT bestimmt werden konnten, ist für diese Versuchsserie in Tabelle II sowohl die Anzahl der Versuchstiere als auch die Anzahl der jeweils für die genannten Variablen ausgewerten Meßwerte angegeben.

### Versuchsserie A: Perinataler Plasmaleptinspiegel

Zeitpunkt	$\Sigma$ insg.	$\Sigma$ Wurf	+/+	+/ <i>fa</i>	<i>fa/fa</i>
postnatal ~10 min	103	11	20	58 (32/34)	25
pränatal ~4 h	46	5	9	22 (7/15)	15
pränatal ~24 h	21	2	9	12	

### Versuchsserie B: Methodische Untersuchungen bei +/+ Tieren

Plasmaleptinspiegel im circadianen Minimum und Maximum  
des Kerntemperaturrhythmus

$\Sigma$ insg.	$\Sigma$ Wurf
30	3

Zusammenhang zwischen Plasmaleptinspiegel,  
Körperzusammensetzung und Lebensalter

Alter	$\Sigma$ insg.	$\Sigma$ Wurf
d6	12	1
d7	31	8
d8	23	2
d10	16	6
d12	8	2
d16	34	8
d24	38	10
d34	11	3

Tabelle I: Anzahl der Versuchstiere in Versuchsserie A und B getrennt nach Genotyp und Zeitpunkt der Untersuchung bzw. Alter. Da (um Verzerrungen durch Unterschiede zwischen Würfen, die nur zwei der drei Genotypen enthielten, auszuschließen) die Unterschiede zwischen *fa/fa* und +/*fa* Tieren sowie zwischen +/+ und +/*fa* Tieren in separaten Varianzanalysen ermittelt wurden (siehe 2.6.2.), wurde für Versuchsserie A die Anzahl der für die jeweiligen Varianzanalysen herangezogenen +/*fa* Tiere zusätzlich separat aufgeführt (Werte in Klammern).

### Versuchsserie C: Regulation des Plasmaleptinspiegels bei 10 Tage alten Ratten

#### Tierzahl

Versuchsgruppen	$\Sigma$ insg.	$\Sigma$ Wurf	+/+	+/fa	fa/fa
<b>Normale Aufzucht</b>	105	12	23	56	26
<b>Künstliche Aufzucht</b>	83	9	11	33	39
Kältebelastung	17	2	6	7	4
Thermoneutral 2 d	20	2	5	6	9
Thermoneutral 6 d	20	2		7	13
Noradrenalin, Fett ↗	17	2		7	10
Noradrenalin, Fett ↘	9	1		6	3

#### Anzahl der ausgewerteten Meßwerte

Versuchsgruppen	Plasmaleptin			BAT mRNA			WAT mRNA		
	+/+	+/fa	fa/fa	+/+	+/fa	fa/fa	+/+	+/fa	fa/fa
<b>Normale Aufzucht</b>	13	33 (20/25)	15	17	29 (24/25)	11	20	28 (23/14)	11
<b>Künstliche Aufzucht</b>	9	29	37	9	28	37	9	28	36
Kältebelastung	4	3	2	4	3	2	4	3	2
Thermoneutral 2 d	5	6	9	5	6	9	5	5	9
Thermoneutral 6 d		7	13		7	13		4	13
Noradrenalin, Fett ↗		7	10		6	10		7	9
Noradrenalin, Fett ↘		6	3		6	3		6	3

Tabelle II: Da in Versuchsserie C nicht bei allen Tieren sowohl Plasmaleptinspiegel wie auch die Leptin-mRNA-Konzentration im BAT und WAT bestimmt werden konnten, sind hier sowohl die Anzahl der verwendeten Tiere wie die Anzahl der für jede der Variablen ausgewerteten Messungen für jede Versuchsgruppe und die drei Genotypen dargestellt. Die N-Zahl für die Analyse der Körperzusammensetzung entspricht der für die Plasmaleptinwerte. Von den zwölf normal aufgezogenen Würfen wurden bei sieben (#1-7) der Plasmaleptinspiegel und die Körperzusammensetzung und in dreien davon sowie in fünf weiteren Würfen nur die Leptin-mRNA-Konzentration bestimmt. Bei den neun künstlich aufgezogenen Würfen (#8-16) wurden in der Regel von jedem Tier sowohl Plasmaleptinspiegel und Körperzusammensetzung als auch die Leptin-mRNA-Konzentration ermittelt. Erklärung für die geteilte Auswertung der Daten von den normal aufgezogenen +/fa Tieren siehe Tabelle I. Bei den künstlich aufgezogenen Tieren war dies aufgrund der Genotypverteilung in den Würfen nicht notwendig.



## 2.2. Versuchstiere

### 2.2.1. Zucht

Alle Versuchstiere wurden in der Zuchtkolonie des W.G. Kerckhoff-Institutes in Bad Nauheim selbst gezogen. Es waren Nachkommen von reinerbigen Zuckerratten (13 M) und von Kreuzungen zwischen Zuckerratten und Brown-Norway-Ratten (BN), deren Zuckerrattenanteil >96% ist. Zur Zucht wurden weibliche  $+/+$  und  $+/fa$  Tiere eingesetzt, die  $fa/fa$  Weibchen sind steril. Bei den männlichen Tieren können alle drei Genotypen zur Zucht eingesetzt werden, allerdings sind nur einzelne der  $fa/fa$  Männchen fertil, und es kommt auch bei diesen nicht immer zu erfolgreichen Bedeckungen. Die Erzeugung reiner Wildtyp-Würfe wurde durch Paarung von  $+/+$  Elterntieren erreicht. Zur Erzeugung von Wurfgeschwistern mit unterschiedlichen Genotypen wurden die Paarungen vorwiegend so gewählt, daß die Würfe nur zwei verschiedene Genotypen enthielten, um ausreichende Anzahlen für Vergleiche innerhalb eines Wurfes zu erzielen. Dazu wurden zum einen  $+/+$  und  $+/fa$  Elterntiere gekreuzt und zum anderen  $+/fa$  Weibchen mit  $fa/fa$  Männchen.

Die weiblichen Tiere haben einen 4-tägigen Zyklus, der durch tägliche Vaginalabstriche verfolgt werden kann. Die Paarung erfolgte im frühen Östrus. Bei Paarungen mit  $+/+$  und  $+/fa$  Männchen konnte man von einer erfolgreichen Bedeckung ausgehen und die Männchen von den Weibchen trennen, wenn am nächsten Tag Spermien im Vaginalabstrich nachgewiesen wurden. Da es bei der Bedeckung durch  $fa/fa$  Männchen selbst beim Nachweis von Spermien häufig nicht zu einer Gravidität kam, wurde bei diesen Paarungen das Männchen beim Weibchen gelassen und am Tag 4 nach der Bedeckung der Zyklusstand wiederum kontrolliert, um einen erneuten Östrus mit einer eventuell spermienpositiven Paarung zu identifizieren. Blieb der Östrus aus, wurden die Paare getrennt und am Tag 10-13 nach dem letzten Östrus der Zyklusstand erneut durch Abstriche kontrolliert, da in diesem Zeitraum Weibchen, deren Bedeckung mit einem  $fa/fa$  Männchen lediglich zur Pseudogravidität geführt hatte, wieder in den regulären Zyklus mit Östrus zurückkehrten und erneut verpaart werden mußten. Eine normal verlaufende Gravidität konnte spätestens am Tag 16 der Gestation durch eine ausgeprägte Rundung des Bauches deutlich visuell erkannt werden.

Der Tag des (letzten) spermienpositiven Vaginalabstriches wurde als Tag 0 der Trächtigkeit gerechnet (Watts und Gain 1984, Cooke et al. 1986) und konnte zur

Berechnung des voraussichtlichen Geburtstermins verwendet werden. Die Geburt erfolgte in der Regel in den ersten Stunden nach Beginn der Lichtphase am Tag 22 der Gravidität. Als "errechneter Geburtszeitpunkt" wurde deshalb der Beginn der Lichtphase 22 Tage nach dem Spermiennachweis definiert. Gelegentlich traten Frühgeburten bis zu 12 h vor dem errechneten Geburtstermin auf. Fast alle verwendeten Würfe waren zum regulären Geburtszeitpunkt in der Ruhephase am Tag 22 der Gravidität geboren worden. Bei früherer Geburt wurde der errechnete Geburtstermin für die Bestimmung des Lebensalters verwendet. Die Dauer der Austreibungsphase der Geburt variiert stark und liegt normalerweise zwischen ca. 1 ½ und 4 h, sie kann sich aber durch Störungen zu Beginn der Austreibungsphase erheblich verlängern. Die Wurfstärke betrug 9-12 Welpen pro Wurf und das normale Geburtsgewicht lag bei ca. 6 g .

### 2.2.2. Tierhaltung

Die Kolonie befand sich in einem Raum bei 22°C Umgebungstemperatur und 60% relativer Luftfeuchte mit einem 12:12 Licht:Dunkel Zyklus. Adulte Tiere wurden in Gruppen bis zu vier Tieren in Makrolon-Käfigen (Größe M IV, Ebeco, Castrop-Rauxel) auf Holzgranulateinstreu (Altromin, Lage) gehalten. Die Tiere erhielten eine pelletierte Zuchtdiät (Altromin 1314, Altromin, Lage) und Wasser *ad libitum*. Die trächtigen Weibchen wurden am Tag 16 der Trächtigkeit in Einzelkäfigen (Größe M III, Ebeco, Castrop-Rauxel) isoliert, in denen sie bis zum Versuchsbeginn mit ihren Welpen verblieben. Alle normal von der Mutter aufgezogenen Welpen verblieben bis zum Tötungstag bei ihrer Mutter, eine Ausnahme bildeten hier nur die 34 Tage alten Welpen, sie wurden im Alter von Tag 21 abgesetzt. Um nicht unnötig Tiermaterial zu verbrauchen, wurden, zusätzlich zu den speziell für diese Arbeit herangezogenen Tieren, die Daten von 24 und 34 Tage alten Kontrolltieren aus einer anderen Versuchsserie (Eiden et al. 2001) für diese Arbeit neu ausgewertet.

Welpen, bei denen vor Versuchsbeginn eine Genotypisierung durchgeführt werden mußte, wurden, nach Entnahme einer kleinen bis zu 0,4 cm langen Gewebeprobe durch Scherenschnitt vom Schwanz, durch subcutane Tätowierung der Fußsohlen mit schwarzer Tinte (Scriptol, Pelikan, Hannover) nach einem bestimmten Nummerncode eindeutig gekennzeichnet.

## **2.3. Präparationsmethoden**

### **2.3.1. Tötung der Versuchstiere und Blutprobenentnahme**

#### **2.3.1.1. Feten**

Ca. 4 und 24 h vor dem errechneten Geburtstermin wurden die Muttertiere 30-40 s mit reinem CO<sub>2</sub> betäubt und dekapitiert. Der Beginn der Schnittenbindung erfolgte umgehend durch Eröffnung der Linea alba und Inzision eines Uterushornes durch einen medialen Längsschnitt. Nach der vollständigen Entfernung der Feten aus einem Horn wurde auch das zweite Uterushorn eröffnet. Die Feten wurden einzeln unter Durchtrennung der Nabelschnur und Eröffnung der Fruchthüllen entwickelt, wobei darauf geachtet wurde, daß die Plazenta am Fetus verblieb. Jeder Fetus wurde sofort von den Resten seiner Fruchthüllen befreit und trockengerubbelt. Nach dem Einsetzen der Spontanatmung wurden die Feten mit noch anhängender Plazenta in der Reihenfolge ihrer Entnahme auf eine temperierte Unterlage gelegt. Um ein Auskühlen zu verhindern wurden die Feten zusätzlich von oben mit einer Warmlichtlampe angestrahlt. So rasch wie möglich wurden sie in der Reihenfolge der Entnahme aus dem Uterus dekapitiert und eine Blutprobe gewonnen, wobei maximal 15 min zwischen dem Beginn des Eingriffs und der Tötung des letzten Fetus lagen.

#### **2.3.1.2. Neugeborene**

Ca. 12 h vor dem errechneten Geburtstermin wurde der Käfig mit dem trächtigen Muttertier an einen von allen Seiten gut einsehbaren Platz in der Ursprungskolonie versetzt und mit einer kleinen Rotlichtlampe indirekt beleuchtet, damit schon vor dem errechneten Geburtszeitpunkt eine Beobachtung des Tieres stattfinden konnte. In regelmäßigen zeitlichen Abständen wurde, ohne das Muttertier zu stören, eine Sichtkontrolle durchgeführt, ob die Austreibungsphase schon begonnen hatte. Nach Einsetzen der Austreibungsphase wurden die ersten zwei Welpen bei der Mutter belassen, da es sonst zu Störungen des weiteren Geburtsablaufes hätte kommen können. Der weitere Geburtsablauf wurde ununterbrochen verfolgt. Sofort nach der Geburt wurden die nachfolgend geborenen Welpen aus dem Käfig entfernt und in ein Plastikgefäß in einem auf ca. 39°C temperierten Wasserbad verbracht. Nach 5 min wurden die Welpen gewogen und zur Blutentnahme dekapitiert.

### **2.3.1.3. 1-5 Wochen alte Jungtiere**

Die Tiere wurden zu Beginn der Dunkelphase der Kolonie rasch nach Entnahme aus dem Wurfverband bzw. aus den Tierbehältern, in denen die künstliche Aufzucht erfolgte, getötet. Bis zu einem Alter von 10/11 Tagen erfolgte die Tötung durch Dekapitation mit der Schere, ältere Tiere wurden ca. 30 s mit CO<sub>2</sub> betäubt und dann mit einer speziell angefertigten Guillotine dekapitiert.

Bei den Würfen, bei denen die Plasmaleptinspiegel zum Zeitpunkt des Minimums und Maximums des circadianen Tc-Rhythmus bestimmt werden sollten, wurde die Hälfte des Wurfes zu Beginn der Dunkelphase und die andere Hälfte zur Beginn der Lichtphase der Ursprungskolonie getötet. Zur Erhaltung gleicher thermischer und nutritiver Bedingungen für beide Gruppen wurde nach der Tötung der ersten Hälfte des Wurfes die entsprechende Anzahl von gleichaltrigen Welpen aus einem anderen Wurf ersetzt. Ein solcher Welpenaustausch wird von der Mutter ohne Störung des Brutpflegeverhaltens toleriert.

### **2.3.2. Gewinnung von Blutplasma**

Das bei der Dekapitation gewonnene Blut wurde in einem Heparin-Natrium (Liquemin 5000, Hoffmann-La Roche, Grenzach-Wyhlen) enthaltenden Eppendorf Cup aufgefangen (Eppendorf) und sofort gekühlt. Das durch Zentrifugation für 5 min bei 0°C und 2000 x g vom Blutkuchen abgetrennte Blutplasma wurde von diesem abpipettiert, gut durchmischt und in geeignete Aliquots (20-100 µl) für die RIA-Messungen aufgeteilt. Durch Wiegung wurde die Verdünnung durch das Heparin bestimmt und die Meßergebnisse der Plasmaproben mit dem daraus ermittelten Faktor korrigiert. Bis zur Messung wurde das Plasma bei -80°C gelagert.

### **2.3.3. Entnahme von BAT und WAT bei 10 Tage alten Tieren**

Zur Entnahme des interscapulären BAT erfolgte nach der Dekapitation von dorsal ein ca. 1,5 cm langer cervicaler, medialer Hautschnitt. Durch das seitliche Zurückklappen der lateralen Hautlappen lag das Fettdepot offen. Es wurde komplett entnommen (ca. 60 mg), wobei darauf geachtet wurde, daß schon mit weißem Fettgewebe durchsetzte Randbezirke im Tierkörper verblieben. Die Entnahme von WAT erfolgte im Bereich eines Leistenspalts/Oberschenkels, da das inguinale WAT das einzige in den ersten beiden

Lebenswochen gut entwickelte weiße Fettlager ist (Planche und Joliff 1987). Es wurde ein Schnitt vom Leistenspalt bis zum Knie geführt, wonach durch stumpfes Freipräparieren das subcutane weiße Fettpolster freigelegt und ein 10-20 mg schweres Stück entnommen wurde. Die Gewebeproben wurden sofort nach der Entnahme in Kryoröhrchen (Sorensen, USA) rasch bei  $-196^{\circ}\text{C}$  in flüssigem Stickstoff gefroren und danach bei  $-80^{\circ}\text{C}$  bis zur Weiterverarbeitung gelagert.

#### **2.3.4. Eviszeration zur Bestimmung der Körperzusammensetzung**

Die Tierkörper wurden zur Laparotomie in die Rückenlage verbracht. Die Eröffnung in der Medianen erfolgte durch einen Schnitt entlang der Linea alba. Links und rechts entlang der Rippenbögen wurden Entlastungsschnitte gesetzt. Die Milz wurde stumpf von der großen Kurvatur des Magens freipräpariert. Nach Durchtrennung des Ösophagus und des Ligamentum hepatogastricums wurden der Magen und der kraniale Teils des Dünndarms entfernt. Der restliche Darm wurde vom Rektum ausgehend stumpf vom Gekröse getrennt und ebenfalls entnommen. Es wurde somit der komplette Magen-Darm-Trakt entfernt, um den Energiegehalt von dort befindlicher unverdauter Nahrung bzw. Kot bei der Bestimmung der Körperzusammensetzung auszuschließen. Es wurde sorgfältig darauf geachtet, daß alles Fettgewebe, insbesondere im großen Netz und in der vorderen Gekrösewurzel, im Tierkörper verblieb. Die Harnblase wurde eröffnet und gegebenenfalls ihr Inhalt außerhalb des Tierkörpers entleert, damit der Einfluß von Urin auf die Bestimmung des Körperwassergehaltes ausgeschlossen werden konnte. Um bei der folgenden Bestimmung der Körperzusammensetzung eine schnellere Trocknung zu erreichen, wurde zusätzlich der Brustkorb in der Medianen ventral durchtrennt und nach lateral geöffnet.

### **2.4. Analyseverfahren**

#### **2.4.1. Physikalisch-chemische Bestimmung der Körperzusammensetzung**

Zur Bestimmung der Feuchtmasse wurde die eviszerierte Tierkörpermasse ohne Magen-Darm-Trakt und mit entleerter Harnblase gewogen und das durch Wiegung bestimmte Gewicht des entnommenen Blutes hinzugerechnet. Die Feuchtmasse diente im Folgenden als Bezugsgröße für die Bestimmung der prozentualen Körperzusammensetzung. Nach einem etablierten Verfahren (Markewicz et al. 1993, Olbort 1998) wurden die Tierkörper

in eingewogenen Aluminiumschälchen in einem Trockenschrank (Memmert, Schwalbach) bei 75°C bis zur Gewichtskonstanz getrocknet. Hierzu erfolgte die Wiegung rasch nach Entnahme aus dem Trockenschrank, um die Aufnahme von Luftfeuchtigkeit aus der Umgebungsluft zu verhindern. Aus der Differenz zwischen Feucht- und Trockenmasse ergab sich die Körperwassermenge.

Die getrockneten Tierkörper wurden nach Erreichen der Gewichtskonstanz in stabiles Filterpapier verpackt, dessen Ränder umgeschlagen und mit Heftklammern verschlossen wurden, um so den Verlust von Körpertrockenmasse zu verhindern. In diesen Päckchen wurden die Tierkörper durch stumpfen Druck zerkleinert und zur Herauslösung des Körperfettes in einen Extraktionsapparat nach Soxhlet (Merck Eurolab, Frankfurt/Main) verbracht. Dazu wurde ein 1000 ml-Rundkolben mit ca. 700 ml Chloroform (Sigma-Aldrich, Deisenhofen) befüllt, der von einem Heizpilz auf ca. 82°C erhitzt wurde. Auf diesem Rundkolben saß der 500 ml-Extraktionsapparat, in dessen Kolben die einzelnen Tierpäckchen geschichtet wurden. Dabei wurde darauf geachtet, daß sie dort fest saßen und nicht auf dem einfließenden Chloroform schwimmen konnten. Über dem Extraktionsapparat befand sich eine Kühlspirale. Durch die Erhitzung stieg nun Chloroformdampf auf, der bei Erreichen der Kühlspirale kondensierte und von oben in den Extraktionskolben tropfte. Das Chloroform löste das Fett aus den Tierkörpern und zusammen mit dem gelösten Fett lief das Chloroform nach Erreichen des Überlauffüllzustandes über ein Überlaufrohr in den Rundkolben zurück, wobei hier wieder ein neuer Durchlauf begann. Das extrahierte Körperfett wurde aufgrund seines höheren Siedepunktes im Rundkolben retiniert. blieb nach ca. 24 Stunden das Chloroform im Extraktionszylinder klar, war dies ein Zeichen dafür, daß die Extraktion abgeschlossen war. Die Päckchen mit den Tierkörpern wurden aus dem Extraktionsapparat entnommen und nach vollständiger Abdampfung unter sorgfältiger Vermeidung von Substanzverlust wieder ausgepackt und in ihre Aluminiumschalen in den Trockenschrank gelegt. Es folgte dort wieder eine Trocknung und Wiegung bis zur Gewichtskonstanz, das so ermittelte Endgewicht stellte die fettfreie Trockenmasse (FFDM) dar. Aus den Wiegungen wurde die Gesamtkörperfettmasse als Differenz zur Trockenmasse vor der Fettextraktion bestimmt.

Bei Tieren, bei denen eine Probe des BAT und WAT entnommen worden war, wurde die Körperzusammensetzung entsprechend korrigiert. Dazu waren zuvor die durch die Entnahme der Proben bedingten Verluste durch die Analyse gleichgroßer Gewebeproben

von gleichaltrigen Tieren bestimmt worden. Der prozentuale Fehler in der Bestimmung des prozentualen Gesamtkörperfettgehaltes bei den Tieren, bei denen BAT und WAT entnommen wurde, lag nach Entnahme bei 2% und wurde entsprechend korrigiert.

## **2.4.2. Molekularbiologische Genotypbestimmung**

### **2.4.2.1. Isolierung der DNA aus Gewebeproben**

Die Isolierung der DNA aus den Schwanzproben erfolgte mittels Verarbeitung mit dem QIAmp Tissue Kit (Qiagen, Hilden). Die Schwanzproben wurden mit einem Gemisch von jeweils 180 µl ATL-Puffer und 20 µl Proteinase K (Konzentration: 10 mg/ml Aqua destillata) versetzt und für mind. 2-4 h oder über Nacht bei 55°C so lange verdaut, bis vom Schwanz nur noch eine durchsichtige Hülle übrig blieb. Anschließend wurde dieser Ansatz dann mit 200 µl AL-Puffer versetzt, 10 min bei 70°C inkubiert und dann mit 210 µl Ethanol versetzt. Das Gemisch wurde auf eine Minisäule (spin column) pipettiert und bei Raumtemperatur für 2 min bei 10.000 x g zentrifugiert. Dann wurden 500 µl AW-Puffer auf die Säule gegeben und es erfolgte bei Raumtemperatur eine Zentrifugation für 1 min bei 10.000 x g. Nachdem die Minisäule auf ein neues Sammelgefäß gesetzt worden war, wurde dieser Schritt noch einmal wiederholt. Bei diesen Vorgängen band sich die DNA an die Membran der Minisäulen und wurde nach mehrmaligem Waschen mit 50 µl 70°C warmen Aqua destillata eluiert.

### **2.4.2.2. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)**

Jeweils 2 µl isolierte DNA pro Tier wurden mit 48 µl Mastermix versetzt, um einen PCR-Ansatz von 50 µl zu erhalten. Der Master-Mix bestand aus 37,5 µl H<sub>2</sub>O (steril), 5 µl PCR-Puffer 10x, 1 µl dNTP-Mix, 2 µl Primer MoBr 8 und 2 µl Primer MoBr 11 sowie 0,5 µl Taq-Polymerase (2,5 u, Amplitaq Gold).

Die Primer hatten folgende Sequenzen:

sense Primer mObr 8:            5' - TAT GGA AGT CAC AGA TGA TGG-3'

antisense Primer mObr 11:    5' - TCT TAC AAT TGT AGA ATT CTC-3'

Die PCR-Reaktion wurde in einem Thermocycler (Gene Amp R PCR System 2400, Perkin Elmer, Weiterstadt) durchgeführt. Es wurden folgende PCR-Bedingungen eingestellt:

- |                   |       |           |
|-------------------|-------|-----------|
| A. Denaturierung: | 5 min | 94°C      |
| B. 60 Zyklen a.:  | 1.    | 30 s 94°C |
|                   | 2.    | 30 s 50°C |
|                   | 3.    | 30 s 72°C |
| C. Extension:     | 7 min | 72°C      |

Die PCR ergab ein Amplifikat von 112 bp (Chua et al. 1996).

#### 2.4.2.3. Restriktionsverdau

Der Restriktionsverdau wird dadurch ermöglicht, daß die *fa*-Mutation zu einem Aminosäureaustausch von Glutamin zu Prolin im *Lepr* geführt hat (Chua et al. 1996). Die daraus resultierende Nukleotidfolge wird durch die Restriktionsendonuklease MSP1 erkannt. Das Amplifikat eines *fa*-Allels wird durch MSP1 in Fragmente von 78 und 34 bp geschnitten. Für den Restriktionsverdau wurden 15 µl des durch die PCR erhaltenen Amplifikats mit 0,5 µl MSP1 (Boehringer, Ingelheim) für 4 h bei 37°C inkubiert.

#### 2.4.2.4. Elektrophorese

Zur Auftrennung der DNA-Fragmente wurden 7 x 8 cm große, vertikale 10%ige Polyacrylamid-Gele verwendet (Mini Protean II-Kammern, Biorad, München). Es wurden je 10 µl Probe und 0,7 µl Ladepuffer (6-fach, MBI Fermentas, St. Leon-Rot) aufgetragen. Bei 200 Volt wurden die Amplifikate aufgetrennt. Dann wurden die Gele 20 min in Ethidiumbromid (5 µl Ethidiumbromid auf 120 ml TBE 0,5-fach) gefärbt und 5 min in TBE (0,5-fach) gewaschen. Unter UV-Licht bei 366 nm erfolgte die Auswertung der Elektrophorese-Ergebnisse auf dem Transilluminator anhand der sichtbaren Banden. +/+ Tiere können durch eine Bande des 112 bp Amplifikats identifiziert werden, bei *fa/fa* Tieren zeigen sich Banden der 78 bp und 34 bp Amplifikate und bei *+/fa* Tieren alle drei Banden.

#### 2.4.3. Quantitative RT-PCR zur Bestimmung von mRNA-Konzentrationen

Zur Bestimmung der Leptin-mRNA-Konzentration im BAT und WAT wurde die Methode der quantitativen "reverse transcriptase polymerase chain reaction" (RT-PCR) eingesetzt.



Die Messungen mittels RT-PCR wurden von unseren amerikanischen Kooperationspartnern Yiyang Zhang und Rudolph Leibel, Columbia University, New York, durchgeführt. Deshalb erfolgt hier nur eine Kurzübersicht über diese Methode.

Aus dem Fettgewebe wurde die gesamte Ribonukleinsäure (RNA) durch TRIzol Reagenz (Gibco, Bethesda, MD) extrahiert. 1-5 µg der reinen RNA wurde durch Random Hexamer und M-MLV reverse Transkriptase in cDNA rücktranskribiert. Die komplementäre DNA wurde durch die PCR amplifiziert. Dazu wurden spezifische Primer für Leptin in Kombination mit Primern für  $\beta$ -Aktin als interne Kontrolle (Zhang et al. 2001) eingesetzt.

Primer für Leptin	5'-TGACACCAAAACCCTCATCA-3'	(forward)
	5'-AGCCCAGGAA-TGAAGTCCA-3'	(reverse)
Primer für $\beta$ -Aktin	5'-AGGCCAGAGCAAGAGAG-3'	(forward)
	5'-GGGTGTTGAAGGTCTCAAAC-3'	(reverse)

Die als P-dCTP gekennzeichneten PCR-Produkte wurden mit PhosphoImager (Molecular Dynamics) quantitativ bestimmt. Die Leptin-mRNA-Konzentration wurde als Verhältnis zur ebenfalls bestimmten  $\beta$ -Aktin-mRNA wiedergegeben, welche ein Maß für die Anzahl der Zellen darstellt. Die resultierenden Meßergebnisse zeigten bei drei *+fa* Tieren extrem hohe Leptin-mRNA-Konzentrationen im WAT, die von denen gleichbehandelter Wurfgeschwister ohne physiologisch erkennbare Ursachen stark abwichen und unter Umständen auf Meßfehler zurückzuführen sind. Deshalb wurden diese drei Werte weder in die Darstellungen noch in die statistischen Auswertungen einbezogen.

#### **2.4.4. Radioimmunoassay zur Bestimmung des Plasmaleptinspiegels**

##### **2.4.4.1. Durchführung der Messung**

Das Prinzip des Radioimmunoassays (RIA) zur Bestimmung des Plasmaleptinspiegels beruht auf einer Antigen-Antikörper-Reaktion. Das Hormon Leptin stellt hierbei das Antigen dar. Durch die Zugabe eines spezifischen Antikörpers und einer definierten Menge radioaktiv markierten Leptins ("Tracer") kommt es zu einer kompetitiven Verdrängungsreaktion von markiertem und dem zu bestimmenden unmarkierten Leptin an

den Antikörpern. Durch die Erstellung einer Eichkurve mittels bekannter Leptinkonzentrationen kann anhand der gemessenen Radioaktivität die Leptinkonzentration in der jeweiligen Plasmaprobe ermittelt werden.

Zur Durchführung wurde ein kommerzieller Kit (Linco, Maus-Leptin RIA-Kit) verwendet. Für jeden Assay wurde eine zugehörige Eichkurve bestimmt, die auf der Doppelbestimmung 7 verschiedener Leptinstandards aus dem Kit basierte. Außerdem liefen 3 Kontrollansätze mit. Der erste (TO) enthielt nur radioaktiv markiertes Antigen zur Bestimmung der maximalen Radioaktivität, der zweite (NSB) radioaktiv markiertes Antigen und Puffer. Hier konnte gezeigt werden, daß durch unspezifische Bindung an den Puffer und die Gefäßwand weniger als 5% der eingesetzten Radioaktivität verloren gingen. Der dritte Kontrollansatz ( $B_0$ ) enthielt zusätzlich den spezifischen Antikörper, um die maximale Bindungsfähigkeit des Tracers an den Antikörper zu ermitteln.

Die bei -50 bis -80°C verwahrten Bestandteile des Linco-Maus-Leptin RIA-Kits und die benötigten Plasmaproben wurden vor Versuchsbeginn bei Raumtemperatur aufgetaut. In den meisten Fällen wurde eine Plasmaprobe von 100 µl eingesetzt, bei erwarteten hohen Leptinwerten wurde diese Probenmenge auf 50 bzw. 20 µl reduziert. Damit wurde erreicht, daß die gemessenen Leptinwerte möglichst im mittleren linearen Bereich der sigmoiden Eichkurve lagen, um einer überproportionalen Verzerrung der Meßwerte im Randbereich der Kurve entgegenzuwirken. Die Proben wurden mit Assay-Puffer auf 200 µl aufgefüllt, anschließend wurden 100 µl Antikörper-Lösung zugegeben und nach Durchmischung erfolgte über 20-24 h eine Inkubation bei 4°C. Durch diese zeitversetzte Inkubation mit radioaktivem Leptin wurde die Sensitivität des Tests erhöht (non-equilibrium-Methode, Chard 1982). Nach dieser Primärinkubation erfolgte die Zugabe von 100 µl [ $^{125}$ I]-Maus-Leptin in Puffer gelöst zu jedem Ansatz und eine weitere 24 h Inkubation bei 4°C. Danach wurden die Antigen-Antikörper-Komplexe durch Zugabe von 1 ml 'Precipitating reagent' bei 4°C ausgefällt. Nach kurzer Durchmischung, 20 min Inkubation bei 4°C und 20 min Zentrifugation bei 3.000 x g wurde der Überstand abgesaugt und die im präzipitierten Antigen-Antikörper-Komplex gebundene Radioaktivität im Gamma-Counter (Berthold Gamma-Probenwechsler LB 951G, Deutschland) quantitativ bestimmt.

#### **2.4.4.2. Berechnung des Plasmaleptingehaltes**

Die Standardbezugsgröße zur Ermittlung des Plasmaleptingehaltes in ng/ml war eine eingesetzte 100 µl Plasmaprobe. Wurden Aliquots <70 µl im RIA gemessen, mußte berücksichtigt werden, daß laut Herstelleranleitung und arbeitsgruppeneigener Verdünnungsreihen die arithmetisch ermittelten Werte im Durchschnitt ca. 113% der tatsächlichen Leptinkonzentration entsprachen und entsprechend korrigiert werden mußten.

Da das Blut schon bei der Blutentnahme durch eine definierte Heparinlösung verdünnt worden war, wurde durch Multiplikation des RIA-Meßwertes mit dem entsprechenden Verdünnungsfaktor die Leptinkonzentration bezogen auf 100 µl reines Plasma des jeweiligen Tieres errechnet. Bei perinatal entnommenen Plasmaproben, bei denen ein geringeres Blutvolumen zu Heparinverdünnungen >30% führte, zeigte sich ebenfalls, daß die umgerechneten Werte 113% der tatsächlichen Leptinkonzentration entsprachen und es wurde entsprechend korrigiert.

Die Affinität des Rattenleptins zum verwendeten murinen Antikörper ist geringer als die des Mausleptins, deshalb wurde durch Messung von Rattenleptinproben bekannter Konzentrationen ein Faktor ermittelt, mit dessen Hilfe die RIA-Werte in die tatsächlichen Konzentrationen von Rattenleptin umgerechnet wurden.

#### **2.4.4.3. Intra- und Interassay-Variabilität**

Um Aufschluß über die Variabilität innerhalb eines RIAs zu bekommen, wurde in jedem Assay dreifach der Leptingehalt einer gepoolten Charge Plasmaleptin bestimmt, deren Plasmaleptinwert im Bereich zwischen 1 und 3 ng/ml lag, also im gleichen Bereich wie die Versuchstierproben. Die Intraassay-Variabilität, als Abweichung der Einzelwerte vom Mittelwert, lag in allen Fällen unter 5%.

Die Interassay-Variabilität, als Maß für die Variabilität der Messung derselben Probe in verschiedenen Assays, wurde für jedes Tier anhand der Standardabweichung seiner in verschiedenen RIAs bestimmten Probe (Basis: 100 µl Rohwert) vom Mittelwert errechnet und lag im Durchschnitt bei 11%. Um diese Variabilität zu verringern, wurde aufgrund der Mittelwertberechnung einer in allen RIAs mitbestimmten Charge gepoolten Blutes ein

Korrekturfaktor für jeden RIA ermittelt und die Versuchstierproben entsprechend mit diesem Faktor korrigiert.

## **2.5. Künstliche Aufzucht**

Die künstliche Aufzucht von Rattenwelpen unter definierten nutritiven und thermischen Bedingungen ist ein Verfahren, welches bereits in mehreren Veröffentlichungen (Mumm et al. 1989, Kaul et al. 1990, Nuesslein und Schmidt 1990) beschrieben wurde. Deshalb erfolgt hier nur eine kurze Zusammenfassung der Methode.

### **2.5.1. Versuchsaufbau**

Maximal zehn Versuchstiere aus einem Wurf konnten einzeln in durchsichtigen, runden Kunststoffbehältern im Dauerlicht gehalten werden (Abbildung 1). Zur gleichmäßigen Temperierung befanden sich die Behälter in einem beheizten Wasserbad, welches im Inneren einer Klimakammer (Weiss Technik, Lindenstruth) aufgestellt war. Die Einstellung der Umgebungstemperatur in den Tierbehältern erfolgte über die Temperierung des Wasserbades mittels Heizspirale und anhängendem Heiz- und Kühlaggregat, sowie über die Regulation der Lufttemperatur in der Klimakammer. Dabei wurde darauf geachtet, daß die Lufttemperatur in der Klimakammer immer ein Grad unter der Wassertemperatur lag, um einen Niederschlag von Kondenswasser im Tierbehälter zu vermeiden.

Im unteren Bereich der Tierbehälter befand sich eine Metalleinlage, um zu erreichen, daß die Behältnisse zu ca. 2/3 ins Wasser eintauchten. Der Boden der Behälter war mit Zellstoff ausgelegt, um die Exkremente aufzunehmen und die Welpen trocken zu halten und somit Verdunstungskälte zu vermeiden. Ein ebenfalls durchsichtiger, abnehmbarer Kunststoffdeckel mit Dichtung schloß die Behälter nach oben ab. Ein Luftabsaugrohr ( $\varnothing$  3 mm) aus Metall führte durch ein zentrales, ca.  $\varnothing$  5 mm großes Loch im Deckel bis ca. 1,5 cm über den Boden der Behälter. Durch Nachströmen der Luft durch diese Öffnung wurden die Behälter ventiliert. Die Absaugrohre wurden an einem Gestell über dem Wasserbad befestigt und sicherten die Tierbehälter in ihrer Position, ohne deren freie Rotation zu behindern. Auch die Milchleitungen und Thermoelemente wurden durch die zentrale Deckelöffnung aus den Behältern herausgeführt und am Luftabsaugrohr mit

Heftpflastern befestigt, wobei sorgfältig darauf geachtet wurde, daß die freie Rotation der Behälter nicht beeinträchtigt wurde. Durch eine kompensatorische Behälterrotation konnte so ein Verdrillen der Leitungen bei den Bewegungen der Tiere verhindert werden.

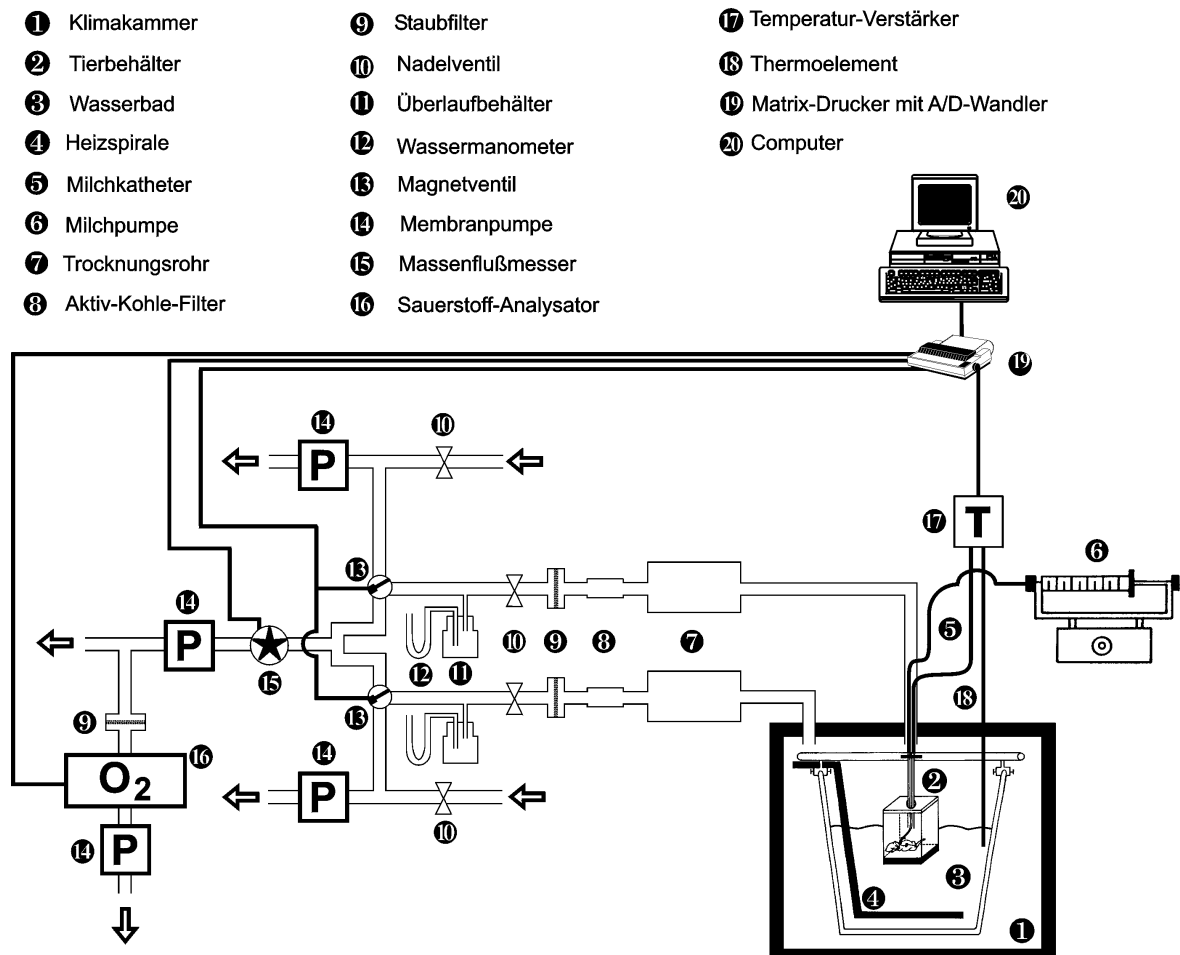


Abbildung 1: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus für die künstliche Aufzucht. Gezeigt ist eine der 10 Tierkammern mit dem zugehörigen O<sub>2</sub>-Meßsystem.

### 2.5.2. Ernährung

Ein Muttermilchersatz wurde aus Kondensmilch (Bärenmarke 10%, Allgäuer Alpenmilch GmbH, München), Maiskeimöl (Mazola Keimöl, Heilbronn), Leitungswasser, Aminosäuren und Mineralien (beide Sigma-Aldrich, Deisenhofen) und Vitaminen (Polybion N-Tropfen, Merck, Darmstadt) nach den Mengenangaben von Messer et al. (1969) hergestellt. Dieses Gemisch wurde homogenisiert und mit einer Vakuumpumpe entgast. Die Milchproben wurden in ca. 100 ml Einheiten portioniert und in Plastikflaschen

einzelnen bei  $-20^{\circ}\text{C}$  eingefroren und nach Bedarf im Kühlschrank ( $+7^{\circ}\text{C}$ ) aufgetaut. Diese Milch hatte einen Fettgehalt von ca. 13% und einen Kaloriengehalt von 8,6 kJ/ml.

Während des Versuches wurde die Milch durch im Kühlschrank stehende Perfusionspumpen (Braun Melsungen AG) kontinuierlich über intraösophageale Katheter den Tieren zugeführt. Diese Katheter bestanden aus einem 3,5 cm langen, weichen Silasticschlauch (602-105, Dow Corning, Midland, USA), der über das unter Hitzeeinwirkung gebogene Ende eines 20 cm langen Polyäthylen-Schlauchs (PP10, Dow Corning, Midland, USA) gezogen wurde. Der intraösophageale Katheter wurde unter Ausnutzung des natürlichen Schluckreflexes so platziert, daß der weiche, kurze Schenkel tief im Ösophagus endete und der gebogene Bereich im Mundwinkel der Welpen zu liegen kam. Heftpflaster fixierten den Katheter an der Wange, verstärkt durch Sekundenkleber, und im Nacken der Tiere. Ein Zwischenstück verband den Katheter mit einem PP50 Schlauch, welcher aus einer Öffnung der Klimakammer hinaus zu den Milchpumpen führte und dort auf der Kanüle der zugehörigen Glasmilchspritze (Braun Melsungen AG) endete. Um eine lückenlose Kühlkette von den Milchpumpen im Kühlschrank bis zum Eintritt der Milchleitungen in die Klimakammer zu gewährleisten, wurden auch die Milchleitungen durch ein Kühlsystem auf ca.  $7^{\circ}\text{C}$  gehalten. Eine Erwärmung erfolgte erst innerhalb der Klimakammer.

Während des gesamten Versuches erfolgte eine kontinuierliche Ernährung der Tiere, wobei die Milchflußraten zwischen den Würfen variierten, aber alle Tiere eines Wurfes stets Milch gleicher Zusammensetzung und Menge erhielten. Die experimentell mögliche Variation der Milchflußrate bei einem gegebenen Alter und unter bestimmten Versuchsbedingungen ist begrenzt (Kaul et al. 1990, Nuesslein und Schmidt 1990). Die maximale Milchflußrate, die einem Wurf verabreicht werden kann, ist dadurch festgelegt, daß sie noch mit der Verdauungsgeschwindigkeit der Tiere in Einklang stehen muß, die die langsamste Verdauungsaktivität aufweisen. Die minimale Milchflußrate ist dadurch festgelegt, daß noch ein gesundes Wachstum der Tiere (durchschnittlich 0,7 g/d) möglich sein muß. Da die Verdauungsgeschwindigkeit mit dem Alter, der Größe der Tiere und den speziellen Versuchsbedingungen variiert, wurde die Milchflußrate zweimal täglich kontrolliert und dem in diesem Alter noch durch die Haut deutlich erkennbaren Magenfüllungszustand angepaßt.

### **2.5.3. Temperaturmessung**

Während der künstlichen Aufzucht wurde kontinuierlich rektal die Körperkerntemperatur ( $T_c$ ) aller Tiere gemessen. Die Messungen erfolgten mit 0,06 mm dünnen Kupfer-Konstantan Thermoelementen (California Finewire, Grover City, CA), welche zum Schutz des empfindlichen Darms von einem PP10-Schlauch umhüllt waren, dessen Ende mit einem 0,5 cm langen Silasticschlauch (602-105) überzogen wurde und dessen Spitze mit Silikon-Kautschuk (E41, Wacker, München) verschlossen war. Die Einführtiefe der Thermoelemente lag bei 4 Tage alten Tieren bei 18 mm und wurde alle 2 Tage um 1 mm erhöht. Die Wasser- und die Lufttemperatur in der Klimakammer wurden ebenfalls kontinuierlich mit Thermoelementen registriert. Die Thermoelemente wurden vor Versuchsbeginn im Bereich zwischen 20 - 40°C kalibriert. Die elektrische Spannung der 12 Thermoelemente wurde durch einen A/D-Wandler digitalisiert und alle 12 s über eine RS-232 C Schnittstelle (Yokogawa) mit Hilfe eines Turbo-Pascal-Programms (Schubert 1991) auf einen AT-PC (Tandon PCA 20 plus) übertragen. Dort erfolgte die Umrechnung der Spannungswerte in Grad Celsius und die Speicherung der Daten. Zusätzlich erfolgte die graphische Darstellung durch einen Drucker (Yokogawa, nbn Elektronik, Herrsching).

### **2.5.4. Sauerstoffmessung**

#### **2.5.4.1. Meßsystem**

Die Analyse der abgesaugten Luft aus den Tierbehältern sowie der Umgebungsluft aus der Klimakammer erfolgte mittels eines elektrochemisch arbeitenden Zwei-Kanal-Sauerstoff-Analysators (S-3A111, Ametek, Pittsburgh, USA) in einem offenen Flußsystem. Der eine Analysatorkanal registrierte während der gesamten Versuchsdauer kontinuierlich den Sauerstoffgehalt der Umgebungsluft. Der zweite Analysatorkanal registrierte in einem zyklischen Durchlauf den Sauerstoffgehalt aus sieben Tierbehältern und der Umgebungsluft als Referenzwert. Jede Einzelmessung dauerte 5 min, so daß ein 40 min Meßzyklus entstand.

Die abgesaugte Luft wurde zur Trocknung durch mit  $\text{CaSO}_4$  gefüllte Röhren geleitet, dann wurde sie durch 500 ml Glasflaschen geführt, um Verbrauchsspitzen der zu analysierenden Luft zu vermeiden. Aktivkohlefilter dienten der Absorption von organischen Molekülen und nachgeschaltete Membranfilter dem Abfangen von Staubpartikeln. Durch

Magnetventile, die mit einem Zeitgeber verbunden waren, wurde die angesaugte Luft entweder zu einem Massenflußmesser (FM 360, Tylan General, Eching bei München) und von dort zum Sauerstoffanalysator geleitet, oder durch ein Bypass-System in den Raum abgeführt. Ein Wassermanometer zwischen beiden Ventilen stellte sicher, daß die Tierluft sowohl in Meß- als auch in Bypassposition mit der gleichen Flußrate abgesaugt wurde. Mit zunehmendem Alter der Tiere wurde die Flußrate, mit der die Luft abgesaugt wurde, von 100 ml/min für 4 Tage alte Tiere schrittweise auf 200 ml/min bei 10 Tage alten Tieren erhöht. Somit wurde der ansteigende Sauerstoffverbrauch der wachsenden Welpen berücksichtigt und die Sauerstoffextraktion aus den Tierbehältern bei ca. 0,5% gehalten. Ein Mehrkanal-Punktplotter (Yokogawa 3081 Hybrid Recorder, NBN Elektronik GmbH, Herrsching) und ein Personalcomputer (Tandon Plus, Tandon Corporation, Chatsworth, USA) zeichneten simultan den Sauerstoffgehalt beider Analysatorkanäle, den jeweils gemessenen Kanal und die Luftflußrate auf.

#### **2.5.4.2. Kalibrierung**

Vor jedem Versuch erfolgte eine Kalibrierung des Sauerstoffanalysators durch Gasgemische mit einem Sauerstoffanteil zwischen 20 und 21%. Die Abweichung vom Sollwert lag stets unter 0,01%. Zur Kalibrierung des Massenflußmessers wurde nach Einstellung eines konstanten Luftflusses die Zeit gestoppt, in der ein Seifenfilm eine definierte Streckenlänge in einem Plexiglasrohr mit bekanntem Durchmesser zurücklegte. Dabei wurde gleichzeitig die im Raum herrschende Temperatur, die Luftfeuchte, sowie der Luftdruck ermittelt. Mit Hilfe dieser Angaben wurde das Luftvolumen nach der Formel

$$V_{\text{STPD}} = V * [(P_B (\text{Barometerdruck}) - P_{\text{H}_2\text{O}} (\text{Wasserdampfdruck})) / 760] * [273 / (273 + t)]$$

unter Standardbedingungen errechnet. Der so errechnete Luftfluß wurde gegen die vom Massenflußmesser angezeigte Spannung aufgetragen und diente zur Erstellung einer Eichkurve, die der Berechnung des Sauerstoffgehaltes zugrunde gelegt wurde.

#### **2.5.4.3. Berechnung der Sauerstoffverbrauchswerte**

Aus den gespeicherten Rohdaten wurden zunächst fehlerhafte Meßwerte, die z.B. durch Herausnahme eines Tieres während oder kurz vor der Meßperiode entstanden waren, eliminiert. Gemäß des oben beschriebenen zyklischen Durchlaufs innerhalb von 40 min



basierte die Ermittlung des Sauerstoffverbrauchs auf ca. 35 einzelnen Meßwerten pro Tier und Tag. Nur die jeweils letzten 2,5 min der 5 min Meßperiode wurden ausgewertet, um Fehler durch im System verbliebene Restluft des zuvor gemessenen Kanals zu vermeiden. Die Spannungsdifferenz, die auftrat, wenn beide Kanäle des Zweikanalsystems getrocknete Umgebungsluft maßen, wurde gleich Null gesetzt und für die Zwischenzeit eine Regression zwischen den aufeinanderfolgenden Nullwerten gebildet. Die Sauerstoffkonzentration in den Tierbehältern entsprach damit der Spannungsdifferenz zwischen den Meßkanälen, die getrocknete Tierluft maßen, und der vom Computer ermittelten Nulllinie.

Die Berechnung des Sauerstoffverbrauchs der Tiere erfolgte nach der Formel für das offene System (Withers 1977), wobei der Berechnung ein respiratorischer Quotient (RQ) von 0,75 zugrunde gelegt wurde. Mittels der diesem RQ entsprechenden Umrechnungsfaktoren von 0,33 W pro ml O<sub>2</sub>/min bzw. 19,86 kJ pro Liter O<sub>2</sub> wurde die Metabolische Rate (MR) bzw. der tägliche Gesamtenergieverbrauch ( $\Sigma$ MR) für jedes Tier berechnet. Die Berechnung des massenspezifischen Sauerstoffverbrauchs bzw. der massenspezifischen Metabolischen Rate (MS-MR) erfolgte, indem mit Hilfe einer linearen Extrapolation die Körpermasse zwischen den täglichen Wiegungen ermittelt wurde.

Für die drei Tiere jeder Versuchsreihe, bei denen nur die Körpertemperatur gemessen werden konnte, wurde anhand der in diesem Alter auftretenden sehr engen linearen Korrelation zwischen Temperatur und Sauerstoffverbrauch (Körtner et al. 1993, Redlin et al. 1992) der individuelle Sauerstoffverbrauch bzw. der massenspezifische Sauerstoffverbrauch aus den Daten ihrer Wurfgeschwister extrapoliert. Die Werte der thermoneutral gehaltenen Tiere liegen so nahe beieinander, daß hier keine Korrelation zur Ermittlung des individuellen Sauerstoffverbrauchs bzw. des massenspezifischen Sauerstoffverbrauchs nötig war und eine einfache Mittelwertbildung aus den Werten der Wurfgeschwister des gleichen Genotyps ausreichte.

#### **2.5.5. Überwachung der künstlichen Aufzucht**

Einmal täglich erfolgte am Abend eine gründliche Kontrolle jedes einzelnen Tieres. Dazu wurde das Tier aus seinem Behältnis entnommen und der Magenfüllungszustand beurteilt. Der Sitz des Milchkatheters wurde überprüft und das Thermoelement wurde entnommen.

Durch rhythmische Massage des Anogenital-Bereichs mit weichem Zellstoff wurden die Tiere stimuliert zu defäkieren und zu urinieren. Danach wurde das Lebendgewicht bestimmt, wobei 0,1 g für das Kathetergewicht abgezogen wurden. Die erneute Anpassung der Einfühlrlänge des Thermoelementes und Neuverklebung der Befestigungspflaster war von großer Wichtigkeit, um die Einführtiefe des Thermoelementes ins Rektum dem Längenwachstum der Tiere anzupassen und wachstumsbedingte Einschnürungen durch zu eng anliegende Heftpflaster zu vermeiden. Die Kontrolle erfolgte unter einem mit Warmluft beheizten Plexiglaskasten, um ein Auskühlen der Tiere während der Versorgung zu verhindern.

Zusätzlich zu dieser Routinekontrolle wurde zwischendurch in Abständen von einigen Stunden die Funktion der gesamten Anlage und die Meßdatenaufzeichnung der Tiere überprüft. Dabei wurde auch der Zustand der Tiere in den durchsichtigen Tierbehältern beobachtet und bei Bedarf wurden die Tiere kurz herausgenommen, um z.B. abgelöste Heftpflaster zu erneuern.

### **2.5.6. Versuchsdurchführung**

In den verschiedenen Versuchsserien wurde die SAA der Welpen durch Veränderung der Umgebungstemperatur und pharmakologische Behandlung manipuliert. Die gewählte Temperatur richtete sich nach den gewünschten Versuchsbedingungen, lag aber generell bei Versuchsbeginn am höchsten und wurde dann entsprechend der durch Wachstum und zunehmendes Haarkleid verbesserten Wärmeisolation und der gesteigerten Wärmeproduktion der Tiere im Versuchsverlauf abgesenkt. Durch Manipulation der Milchflußrate in den möglichen Grenzen (s. 2.5.2.) wurde eine experimentelle Separierung des Einflusses der SAA von Änderungen der Energieströme bzw. der Energiespeicherung angestrebt.

Für alle unter den aufgeführten Versuchsbedingungen künstlich aufgezogenen Würfe zeigt Tabelle III die Summe der zugeführten Milch über den gesamten Versuch sowie die über die Milch zugeführte Energie während der letzten 24 h, die der Berechnung der Nettoenergiezufuhr in diesem Zeitraum zu Grunde liegt (siehe Abbildung 11).

Bedingungen	Wurf #	Versuchsdauer	Σ Milch [ml] insg.	Σ Milch [kJ] letzte 24 h
Kältebelastung	8	2 d	7,5	36,2
	9		6,4	26,5
Thermoneutral	10		6,8	31,0
	11		6,4	29,1
	12	6 d	16,2	28,4
Noradrenalin, Fett ↗	13		15,1	27,3
	14		24,6	41,2
	15		22,5	39,3
Noradrenalin, Fett ↘	16		21,6	33,4

Tabelle III: Insgesamt zugeführte Milchmenge und in den letzten 24 h der Versuche zugeführte Energiemenge für die neun künstlich aufgezogenen Würfe (#8-16).

#### 2.5.6.1. Aufzucht unter moderater Kältebelastung

Zwei Würfe wurden von Lebenstag 8 bis Tag 10 unter moderater Kältebelastung gehalten, um die thermische Belastung bei der Aufzucht durch die Mutter zu simulieren. Dabei mußte darauf geachtet werden, daß die gewählten Temperaturen nicht zu niedrig und die Milchflußrate nicht zu hoch lagen, um die unter diesen Bedingungen auftretende Hypothermie der *fa/fa* Tiere so gering zu halten, daß sie die Magenleerung nicht wesentlich beeinträchtigte, weil nur dann eine gesunde Entwicklung der Tiere ermöglicht wurde. Die hierfür nötigen Umgebungstemperaturen lagen bei ca. 29-30°C (Nüßlein 1992) und die hierzu nötige Gesamtmilchzufuhr (Tabelle III) wurde durch Milchflußraten zwischen 3,3 und 4,2 ml/d erreicht. Unter diesen Bedingungen ergab sich ein 24 h Mittel der MR der *+/+* und *+/fa* Tiere, welches ca. 70% über dem unter thermoneutralen Bedingungen ermittelten Wert von 8,3 W/kg lag.

#### 2.5.6.2. Aufzucht unter thermoneutralen Bedingungen

Die thermoneutrale Aufzucht hatte zum Ziel, die SAA von *fa/fa* und *+/+* bzw. *+/fa* Tieren auf minimalem Niveau zu nivellieren. Basierend auf der Erfahrung früherer Versuche (Nüßlein et al. 1989, Körtner et al. 1994) wurde die Wasser- und Lufttemperatur so gewählt, daß die Tiere eine  $T_c$  zwischen 37,5 und 38,5°C aufwiesen und damit sowohl eine Aktivierung der Kälteabwehr, zu der es bei Ratten im Säuglingsalter erst unterhalb von 37°C kommt (Spiers und Adair 1986), als auch Hitzestress vermieden wurde. Zwei Würfe wurden über 2 Tage (Lebenstag 8-10), zwei andere über 6 Tage (Lebenstag 4-10/11)

thermoneutral gehalten. Die hierfür nötigen Umgebungstemperaturen lagen bei ca. 35-36°C. Die Milchzufuhr wurde bei der Aufzucht über 2 Tage etwa im gleichen Bereich wie bei den unter Kältebelastung aufgezogenen Tieren gehalten (Tabelle III). Bei der Aufzucht über 6 Tage wurde die Milchflußrate, angepaßt an das langsamere Wachstum von künstlich aufgezogenen Tieren, von 2,2 ml/d am Tag 4 auf 3,4 ml/d am Tag 10/11 gesteigert. Die resultierende Gesamtmilchzufuhr über die 6 Tage ist in Tabelle III gezeigt.

### 2.5.6.3. Aufzucht mit Noradrenalin-Behandlung

Die Dauerbehandlung von drei Würfen mit Noradrenalin hatte zum Ziel, eine Steigerung der Aktivität des SNS von *fa/fa* und *+/fa* Tieren auf ein gleich hohes Niveau zu imitieren. Frühere Studien hatten gezeigt, daß bei Ratten im Säuglingsalter die orale Zufuhr von Noradrenalin mit der Milch zu deutlichen physiologischen Reaktionen führt (Körtner et al. 1994, Meierfrankenfeld 1996). Nach einer Eingewöhnungszeit unter thermoneutralen Bedingungen erfolgte ab einem Alter von 5 Tagen eine kontinuierliche Zuführung von Noradrenalin über die Milch. Um Störungen der Magenmotilität und -entleerung zu vermeiden, wurde die Noradrenalin-Dosis zweimal täglich schrittweise so erhöht, daß die MR im Anfang nur minimal über ihrem Wert unter thermoneutralen Bedingungen lag und innerhalb der 6 Versuchstage allmählich bis auf ca. 100% über das Thermoneutralniveau gesteigert wurde. Die hierfür benötigten Noradrenalin-Konzentrationen waren ungefähr aus früheren Versuchen bekannt (Körtner et al. 1994, Meierfrankenfeld 1996). Und zwar wurden Noradrenalin-Dosen zwischen  $270 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$  zu Beginn des Versuches und maximal  $1050 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$  am Versuchsende verwendet, wobei alle Tiere eines Wurfes die gleiche Dosis erhielten. Zur Ermittlung der benötigten Menge reinen Noradrenalins, zur Zubereitung der gewünschten Dosis der mit Noradrenalin versetzten Kunstmilch, wurde abends und morgens das durchschnittliche Körpergewicht der Tiere eines Wurfes bestimmt und in folgende Formel eingesetzt:

$$\frac{\text{Dosis } [\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}] * \varnothing \text{Körpermasse } [\text{kg}] * \text{gesamte angesetzte Milchportion } [\text{ml}] * 24}{\text{Noradrenalin Stammlösung } [\mu\text{g}/\mu\text{l}] * \text{Milchrate pro Stunde } [\text{ml}]}$$

Es wurde eine Noradrenalin Stammlösung von  $50 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$  in 0,1% Ascorbinsäurelösung verwendet. Zu ihrer Herstellung wurde das Bitartrat Salz des Noradrenalins (Arterenol, 99%) verwendet, es enthielt 53% reines Noradrenalin. Die Stammlösung wurde alle 3 Tage

frisch angesetzt und unter Lichtausschluß im Kühlschrank bei +7°C aufbewahrt. Morgens und abends wurde jeweils frisch eine neue Milchportion mit der Noradrenalinlösung versetzt und in die Milchspritzen gefüllt. Die Verbindung zu den Kathetern wurde für ca. 10 min gelöst und in dieser Zeit wurden die Milchleitungen mit dem neuen Milchsatz komplett durchgespült, so daß ohne Verzögerung durch die langen Zuführungsleitungen sofort die neue Dosis zur Wirkung kam.

Die Milchflußrate während der 6-tägigen Versuchsreihen wurde so angepaßt, daß die Würfe #14 und 15 mit den maximalen Milchflußraten (ansteigend von anfangs 2,0 auf 5,1 ml/d am Versuchsende) versorgt wurden, die mit der Magenentleerung unter diesen Bedingungen noch verträglich waren. Wurf #16 dagegen wurde mit der minimalen Milchflußrate (ansteigend von 2,0 auf 4,0 ml/d) versorgt, die notwendig war um ein gesundes Wachstum unter diesen Bedingungen zu ermöglichen (s. 2.5.2.). Durch diese Variation der Milchezufuhr unter Berücksichtigung des Energieverbrauches konnte in den Würfen #14 und 15 eine normale Einlagerung von Körperfett aufrecht erhalten werden, wohingegen bei Wurf #16 die Einlagerung von Körperfett erniedrigt war.

Da durch die Behandlung mit Noradrenalin die Wärmeproduktion der Welpen gesteigert wurde, mußte bei diesen Würfen besonders genau darauf geachtet werden, daß die dadurch eintretende Erhöhung der T<sub>c</sub> durch eine Absenkung der Wasser- und Lufttemperatur abgefangen wurde, um die T<sub>c</sub> möglichst in dem Temperaturbereich bis 38,5°C zu halten. Allerdings läßt sich dies aufgrund des raschen und variablen Anstiegs der T<sub>c</sub> nicht immer vermeiden, kurzfristige Anstiege der T<sub>c</sub> bis 40°C werden von Jungtieren aber ohne Schäden toleriert (Körtner et al. 1994, Schmidt et al. 1986 a).

## **2.6. Statistik**

### **2.6.1. Allgemeine Angaben zur statistischen Auswertung**

Die statistischen Tests wurden mittels des Windowsprogrammes SigmaStat (SPSS Corporation, Chicago, USA) durchgeführt. Bei allen statistischen Verfahren wurde ein Signifikanzniveau von  $p < 0,05$  zu Grunde gelegt. Bei den statistischen Auswertungen konnte auf die Einbeziehung des Faktors Geschlecht verzichtet werden, da in vorausgehenden Untersuchungen des Körperfettgehaltes und des Leptinsystems junger

Ratten zwar Geschlechtsunterschiede, aber niemals Genotyp X Geschlechts-Interaktionen festgestellt wurden (Olbort 1998, Meierfrankenfeld et al. 1986 , Kraeft et al. 1999).

### **2.6.2. Zweifaktorielle Varianzanalysen**

In den Versuchsserien A und C wurden mittels zweifaktorieller Varianzanalysen gewichtete Mittelwerte berechnet (Sachs 1997), wobei jeweils Wurf und Genotyp als Faktoren verwendet wurden. Da alle Messungen für die Tiere eines Wurfes stets im gleichen Meßdurchgang erfolgten, wurden durch dieses Verfahren gleichzeitig störende Einflüsse der Variabilität zwischen verschiedenen Meßdurchgängen herausgefiltert. Als Maß der Streuung wurde der mittlere Fehler des gewichteten Mittelwertes (SEM) angegeben. Die Unterschiede zwischen *fa/fa* und *+/fa* sowie zwischen *+/fa* und *+/+* Tieren wurden in separaten zweifaktoriellen Varianzanalysen ermittelt, um eine Verzerrung durch Würfe, die nur zwei Genotypen enthielten, zu vermeiden. Die Anzahl der jeweils analysierten Werte, deren Mittelwerte in den Abbildungen dargestellt sind, ist den Tabellen I und II zu entnehmen.

### **2.6.3. Regressionsanalysen**

#### **2.6.3.1. Lineare Regression**

In den Versuchsserien B und C wurden die Daten auch mittels linearer Regressionen nach der Methode der kleinsten Fehler-Quadrate ausgewertet. Die Signifikanz der Korrelationen wurde durch die Prüfung der Korrelationskoeffizienten (*r*) auf die Verschiedenheit von Null anhand der *t*-Verteilung getestet (Sachs 1997). Falls erforderlich wurden Regressionsgeraden nach Brownlee (1965) mit Hilfe eines hauseigenen Statistikprogrammes auf Parallelität getestet. War die Nullhypothese der Parallelität nicht abzulehnen ( $p > 0,05$ ), wurden die zugehörigen *y*-Achsenabschnitte miteinander verglichen.

#### **2.6.3.2. Multiple Lineare Regression**

Um die Zusammenhänge zwischen Plasmaleptinspiegel, Leptin-mRNA-Konzentration und anderen relevanten physiologischen Parametern zu ermitteln, wurden in Versuchsserie C Multiple Lineare Regressionsanalysen durchgeführt. Plasmaleptinkonzentration und Leptin-mRNA-Konzentration im BAT und WAT wurden logarithmiert, um ihre Verteilung

zu normalisieren. Als weitere Variablen wurden folgende Größen in die Untersuchung einbezogen:

- ◇ SAA, repräsentiert durch den Gesamtenergieverbrauch ( $\Sigma$ MR) während der letzten 24 h vor Versuchsende
- ◇ Körperfettmasse, als Surrogatvariable für den zellulären Lipidgehalt
- ◇ akute Nettoenergiezufuhr während der letzten 24 h vor Versuchsende, als Surrogatvariable für die zellulären Energieströme
- ◇ FFDM als Maß für die Größe der Tiere
- ◇ Genotyp

Das Signifikanzniveau und der standardisierte Korrelationskoeffizient ( $\beta$ ) wurden verwendet, um die Einflüsse der unabhängigen Variablen auf die abhängige Variable zu charakterisieren. Das Quadrat des multiplen Korrelationskoeffizienten ( $R^2$ ) für die Regressionsanalyse ist ein Maß dafür, wie stark die abhängige Variable von den unabhängigen Variablen bestimmt wird. Die Best-Subset-Regressionsanalyse diente zur weiteren Analyse der in der Multiplen Linearen Regressionsanalyse untersuchten Modelle. Sie analysiert die Abhängigkeit einer untersuchten Variablen von mehreren unabhängigen Variablen schrittweise, indem die unabhängigen Variablen nacheinander in das Analysemodell einbezogen werden. So kann der Prozentsatz der Variabilität einer abhängigen Variablen von einer unabhängigen Variablen ermittelt werden.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Auswirkungen der Gendosis auf den perinatalen Plasmaleptinspiegel (Versuchsserie A)

##### 3.1.1. Plasmaleptinspiegel nach natürlicher Geburt

Die Untersuchung des Plasmaleptinspiegels von Rattenwelpen 10 min nach der natürlichen Geburt bestätigte, daß bereits in diesem Alter ein meßbarer Plasmaleptinspiegel vorhanden ist (Dessolin et al. 1997). Der Plasmaleptinspiegel variiert dabei erheblich zwischen verschiedenen Würfen, wobei die meisten Tiere jedoch einen Plasmaleptinspiegel zwischen 1 bis 5 ng/ml aufweisen (Abbildung 2). Von 20 neugeborenen Wildtyp-Tieren (Würfe #1-6) weisen 70% einen Plasmaleptinspiegel zwischen 0,5 und 2 ng/ml auf, nur 20% zeigen einen Plasmaleptinspiegel der noch unter 0,5 ng/ml liegt und 10% zeigen Werte über 2 ng/ml. Obwohl der *fa*-Defekt des Leptinrezeptors als rezessiv gilt, ist deutlich zu erkennen, daß in diesem Alter die Plasmaleptinkonzentration der *+/fa* Tiere (#1-11) höher ist als die ihrer Wildtyp-Wurfgeschwister. So weisen 60% der 58 neugeborenen *+/fa* Tiere einen Plasmaleptinspiegel  $>2$  ng/ml auf, wobei aber nur 10% einen Wert von  $>4$  ng/ml erreichen. Von den *+/fa* Tieren, die einen Plasmaleptinspiegel  $<2$  ng/ml haben, weisen nur 5% Werte unter 1 ng/ml auf. Tiere, die homozygot für den Leptinrezeptordefekt (#5-11) sind, dominieren dagegen das obere Ende des Meßbereiches. Von den 25 neugeborenen *fa/fa* Tieren weisen 90% einen Plasmaleptinspiegel von über 2 ng/ml auf, 40% davon sogar einen Wert  $>4$  ng/ml, und kein *fa/fa* Tier zeigt Werte unterhalb von 1 ng/ml.

Die visuelle Kontrolle der Datenverteilung ergab keinerlei Anzeichen dafür, daß die beobachteten starken Wurfunterschiede mit dem *+/+* oder *+/fa*- Genotyp der Muttertiere in Verbindung standen. Um die festgestellte starke Variabilität zwischen den Würfen zu berücksichtigen, wurde die Wurfzugehörigkeit als ein Faktor in den statistischen Auswertungen verwendet. Da viele Würfe nur zwei Genotypen enthielten, mußten, um Verzerrungen auszuschließen, getrennte zweifaktorielle Varianzanalysen zum Vergleich von *+/+* und *+/fa* Tieren sowie zum Vergleich von *+/fa* und *fa/fa* Tieren durchgeführt werden. Die daraus resultierenden gewichteten Mittelwerte und SEM zeigt das linke Diagramm der Abbildung 3. Durch Berücksichtigung der Wurfunterschiede wird somit deutlich, daß nicht nur die Plasmaleptinkonzentration der *fa/fa* Welpen ca. 50% höher ist



( $p < 0,001$ ) als die der  $+/fa$  Welpen, sondern daß auch die Plasmaleptinkonzentration der  $+/fa$  Tiere ca. 50% höher ist ( $p < 0,001$ ) als die ihrer  $+/+$  Wurfgeschwister.

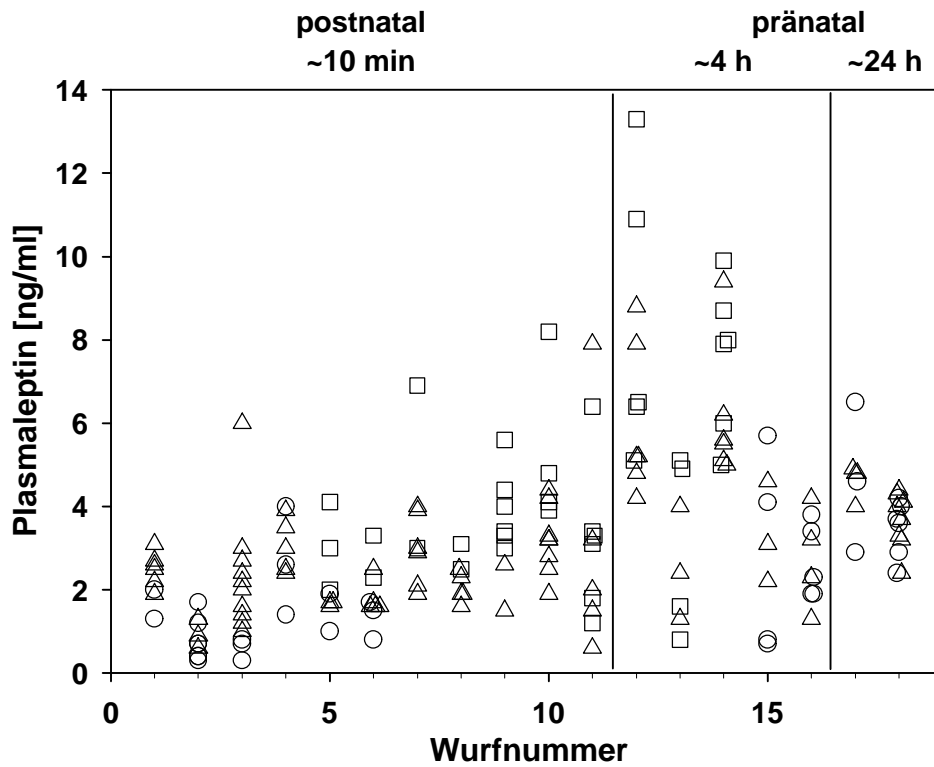


Abbildung 2: Perinataler Plasmaleptinspiegel von Rattenwelpen in Abhängigkeit von Wurfzugehörigkeit und Zeitpunkt der Probenentnahme, d.h. 10 min nach natürlicher Geburt bzw. 4 und 24 h vor dem errechneten Geburtszeitpunkt. Genotypen  $+/+$  (○),  $+/fa$  (△) und  $fa/fa$  (□).

### 3.1.2. Pränataler Plasmaleptinspiegel

Um festzustellen, ob die Unterschiede im Plasmaleptinspiegel zwischen den drei Genotypen auch schon pränatal auftreten, wurden 5 Würfe (#12-16 in Abbildung 2) ca. 4 h vor dem Beginn des errechneten Geburtstermins per Kaiserschnitt entwickelt und der Plasmaleptinspiegel bestimmt. Bei dem Vergleich der Werte der  $+/fa$  Tiere, die in allen 5 Würfen vertreten waren, mit denen der postnatal ermittelten Plasmaleptinkonzentrationen der Tiere des gleichen Genotyps fällt auf, daß bei zwei Würfen (#12, 14) alle Werte zwischen 4 und 10 ng/ml liegen, während bei den anderen Würfen (#13, 15, 16) ähnliche Plasmaleptinspiegel wie nach der natürlicher Geburt auftreten. Da die Würfe #12 und 14 ca. 5 h und die Würfe #13, 15, 16 ca. 3 h vor dem errechneten Geburtstermin durch Kaiserschnitt entwickelt worden waren, ergab sich die Frage, ob die beobachteten

Unterschiede Folge einer starken zeitlichen Änderung des Plasmaleptinspiegels am letzten Tag vor der Geburt sein könnten. Deshalb wurden noch zwei Kaiserschnitte (#17, 18) ca. 24 h vor dem errechneten Geburtstermin durchgeführt. Bei diesen Würfen zeigte jedoch keines der  $+/fa$  Tiere einen Plasmaleptinspiegel über 5 ng/ml und 50% ihrer Meßwerte lagen unterhalb von 4 ng/ml (Abbildung 2). Im Vergleich zu den postnatal bestimmten Plasmaleptinspiegeln der  $+/fa$  Tiere fällt auf, daß ca. 24 h vor der Geburt 100% der Werte der  $+/fa$  Tiere über 2 ng/ml liegen. Die Werte der in diesen Würfen ebenfalls vorkommenden  $+/+$  Tiere weisen ebenfalls eine Verschiebung in höhere Bereiche auf, auch hier liegt kein Wert unter 2 ng/ml. Damit bleibt die Möglichkeit bestehen, daß zwischen 24 und 3 h vor der Geburt vorübergehend erhöhte Plasmaleptinspiegel auftreten, eine Vermutung, die jedoch angesichts der Unsicherheit der Bestimmung des Zeitpunktes der natürlichen Geburt und der beschränkten Anzahl der für Kaiserschnitte zur Verfügung stehenden Zuchttiere offen bleiben muß.

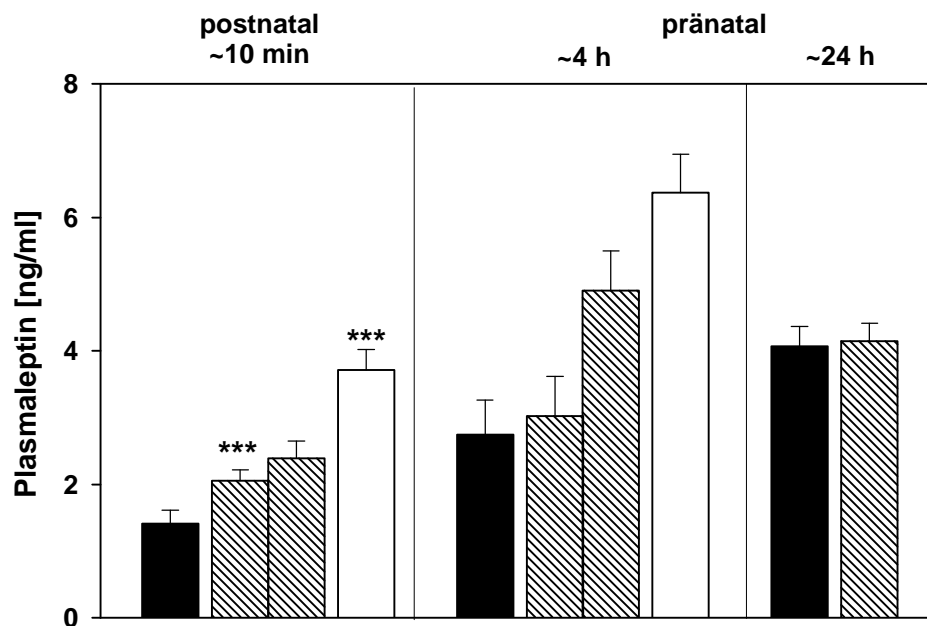


Abbildung 3: Gewichtete Mittelwerte  $\pm$  SEM des perinatalen Plasmaleptinspiegels von Rattenwelpen. Vergleich zwischen  $+/+$  (schwarz) und  $+/fa$  (gestreift) Wurfgeschwistern, sowie  $+/fa$  und  $fa/fa$  (weiß) Wurfgeschwistern ca. 10 min nach der natürlichen Geburt sowie nach Kaiserschnittentbindung ca. 4 und 24 h vor dem errechneten Geburtstermin. Die signifikanten Unterschiede sind gekennzeichnet (\*\*\*) =  $p < 0,001$ .

Aber unabhängig davon, ob die beobachteten starken Unterschiede im mittleren Plasmaleptinspiegel der ca. 4 h vor der Geburt entwickelten Würfe auf eine zeitliche Veränderung oder auf andere Faktoren zurückzuführen sind, konnten durch zweifaktorielle Varianzanalysen die Genotypunterschiede von der durch die Wurfunterschiede bedingten

Variabilität separiert werden. Für die im mittleren Diagramm der Abbildung 3 dargestellten Ergebnisse wurden ca. 4 h vor dem errechneten Geburtstermin keine signifikanten Unterschiede zwischen  $+/+$  und  $+/fa$  einerseits sowie zwischen  $+/fa$  und  $fa/fa$  Wurfgeschwistern andererseits gefunden. Wie das rechte Diagramm von Abbildung 3 zeigt, bestand ca. 24 h vor dem errechneten Geburtstermin zwischen den  $+/+$  und  $+/fa$  Wurfgeschwistern ebenfalls kein signifikanter Unterschied in ihrem Plasmaleptinspiegel, für  $fa/fa$  Tiere liegen für diesen Zeitpunkt keine Daten vor. Obwohl aufgrund der großen Wurfunterschiede ein statistischer Vergleich der zu verschiedenen Zeitpunkten bestimmten Plasmaleptinspiegel nicht zulässig ist, fällt jedoch auf, daß nach Berücksichtigung der Genotypunterschiede die Plasmaleptinwerte der  $+/+$  und  $+/fa$  Tiere ca. 4 h vor dem errechneten Geburtstermin im Durchschnitt ca. 30% höher und ca. 24 h vor dem errechneten Geburtstermin fast 50% höher sind als postnatal.

### *Schlußfolgerung*

*Die vorliegenden Daten zeigen, daß bereits kurz nach der natürlichen Geburt ein deutlicher Unterschied im Plasmaleptinspiegel zwischen den Genotypen  $+/+$ ,  $+/fa$  und  $fa/fa$  vorhanden ist, während pränatal keine signifikanten Gendosis-Effekte nachgewiesen werden konnten. Da die frühesten postnatal bei  $fa/fa$  Tieren nachgewiesenen Störungen in einem erniedrigten sympathischen Antrieb bestehen (Körtner et al. 1994), könnte das Fehlen einer Beziehung zwischen dem pränatalen Plasmaleptinspiegel und der Gendosis eventuell darauf beruhen, daß aufgrund der fehlenden Kältestimulation im Uterus die sympathische Aktivität aller Welpen auf einem sehr niedrigen Niveau nivelliert ist. Eine experimentelle Analyse dieser Hypothese im perinatalen Zeitraum würde jedoch erhebliche methodische Probleme aufwerfen, deshalb wurden entsprechende Untersuchungen zur Klärung der Rolle der sympathischen Aktivität für die Ausbildung von Gendosis-Effekten im Plasmaleptinspiegel an älteren Tieren angestrebt.*

### **3.2. Methodische Untersuchungen an Wildtyp-Tieren (Versuchsserie B)**

#### **3.2.1. Plasmaleptinspiegel zum Zeitpunkt des circadianen Minimums und Maximums des Kerntemperaturrhythmus von 10 Tage alten Tieren**

Da vorhergehende Untersuchungen Unterschiede im Plasmaleptinspiegel von 10 Tage alten  $+/+$ ,  $+/fa$  und  $fa/fa$  Tieren nachgewiesen hatten, die unabhängig von Unterschieden im Körperfettgehalt waren (Zhang et al. 1997, Olbort 1998), bot sich diese Altersstufe für entsprechende Untersuchungen zur Klärung der Ausbildung von Gendosis-abhängigen Unterschieden im Plasmaleptinspiegel an. Da weiterhin bekannt ist, daß in den ersten zwei Lebenswochen der Ratte ein markanter Tagesrhythmus der sympathisch vermittelten thermoregulatorischen Aktivität auftritt (Nuesslein-Hildesheim und Schmidt 1994, Redlin et al. 1992), mußte zuvor festgestellt werden inwieweit der Tageszeitpunkt der Probenentnahme für die Plasmaleptinspiegel-Messung einen Einfluß auf die Höhe des Plasmaleptinspiegels von Wildtyp-Tieren hat. Von drei normal aufgezogenen Wildtyp-Würfen (N=30 Tiere) wurde die Hälfte der Tiere zum Zeitpunkt des Minimums des juvenilen Kerntemperaturrhythmus und die andere Hälfte zum Zeitpunkt des Maximums des juvenilen Kerntemperaturrhythmus zur Blutentnahme getötet. Der Plasmaleptinspiegel ist in Abbildung 4 in Abhängigkeit von der Körpermasse dargestellt. Es zeigt sich deutlich, daß die Regressionsgeraden für die zum Zeitpunkt des Tagesminimums und -maximums bestimmten Werte in diesem Alter nahezu deckungsgleich sind. Dementsprechend weist die Plasmaleptinkonzentration pro g Körpergewicht bei 10 Tage alten Tieren keinen Unterschied zwischen der Blutprobenentnahme zum Zeitpunkt des circadianen Minimums und Maximums des Kerntemperaturrhythmus auf (2-Way-ANOVA,  $p \gg 0,05$ ).

#### **3.2.2. Entwicklungsbedingte Veränderungen der Körperzusammensetzung und des Plasmaleptinspiegels zwischen der 1. und 5. Lebenswoche**

Da bekannt ist, daß es bei Mäusen unabhängig von Veränderungen der Körperfettmasse zu einem 5-10 fachen Anstieg des Plasmaleptinspiegels in der zweiten postnatalen Lebenswoche kommt (Ahima et al. 1998), sollte überprüft werden, ob und gegebenenfalls wann diese "Leptinsurge" auch bei der Ratte im Säuglingsalter auftritt, um zu vermeiden, daß weitere Untersuchungen des Plasmaleptinspiegels in einer instabilen Phase der Regulation des Plasmaleptinspiegels durchgeführt werden. Dazu wurde von 173  $+/+$  Ratten aus 40 verschiedenen Würfen im Alter zwischen 6 und 34 Tagen, die im

normalen Wurfverband von der Mutter aufgezogen wurden, der Plasmaleptinspiegel bestimmt. Da es bekanntlich eine enge Korrelation zwischen Plasmaleptinspiegel und Körperfettmasse gibt, wurde bei diesen Tieren zudem die Körperzusammensetzung bestimmt.

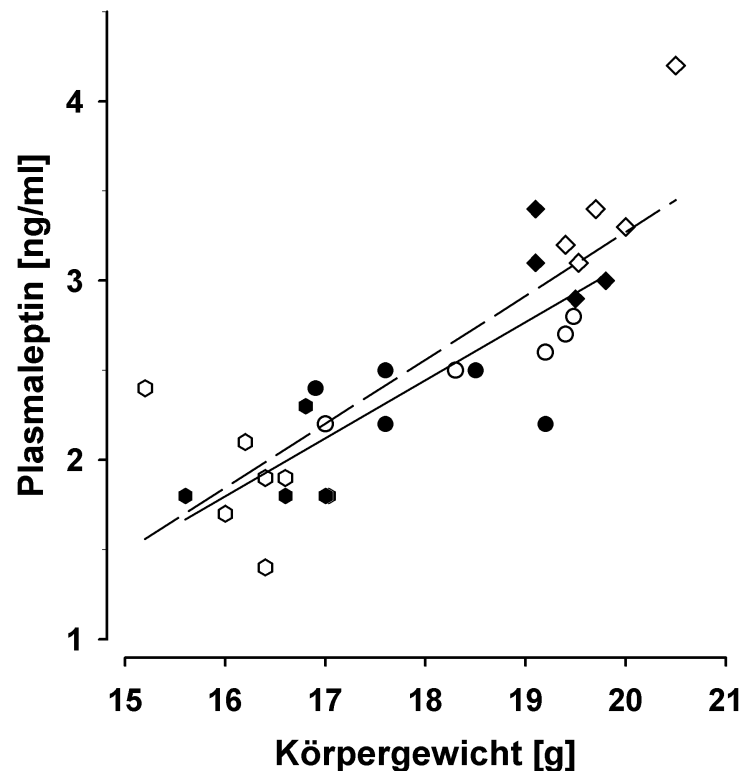


Abbildung 4: Korrelation zwischen Plasmaleptinspiegel und Körpergewicht bei 10 Tage alten Wildtyp-Tieren aus Würfen, die durch unterschiedliche Symbole gekennzeichnet sind ( $\circ$ ,  $\bullet$ ,  $\diamond$ ). Die zur Zeit des circadianen Maximums (offene Symbole, - - -,  $r = 0,73$ ) und circadianen Minimums (geschlossene Symbole, —,  $r = 0,63$ ) bestimmten Plasmaleptinspiegel unterscheiden sich nicht.

### 3.2.2.1. Fettgehalt und Wassergehalt

Bei Tieren einer bestimmten Altersstufe ist die Korrelation zwischen prozentualem Körperfettgehalt und prozentualem Körperwassergehalt so eng, daß sie zur methodischen Kontrolle der bei der Bestimmung der Körperzusammensetzung erhaltenen Werte dienen kann. Abbildung 5 zeigt diesen Zusammenhang für Tiere zwischen der 1. und 5. Lebenswoche. Weder die Stärke der Korrelation noch die Steigung verändert sich systematisch mit dem Lebensalter. Mit zunehmendem Alter kommt es aber zu einer deutlichen Links-Verschiebung der Geraden, d.h. bei gleichem prozentualem Fettgehalt ist der prozentuale Wassergehalt älterer Tiere erheblich niedriger.

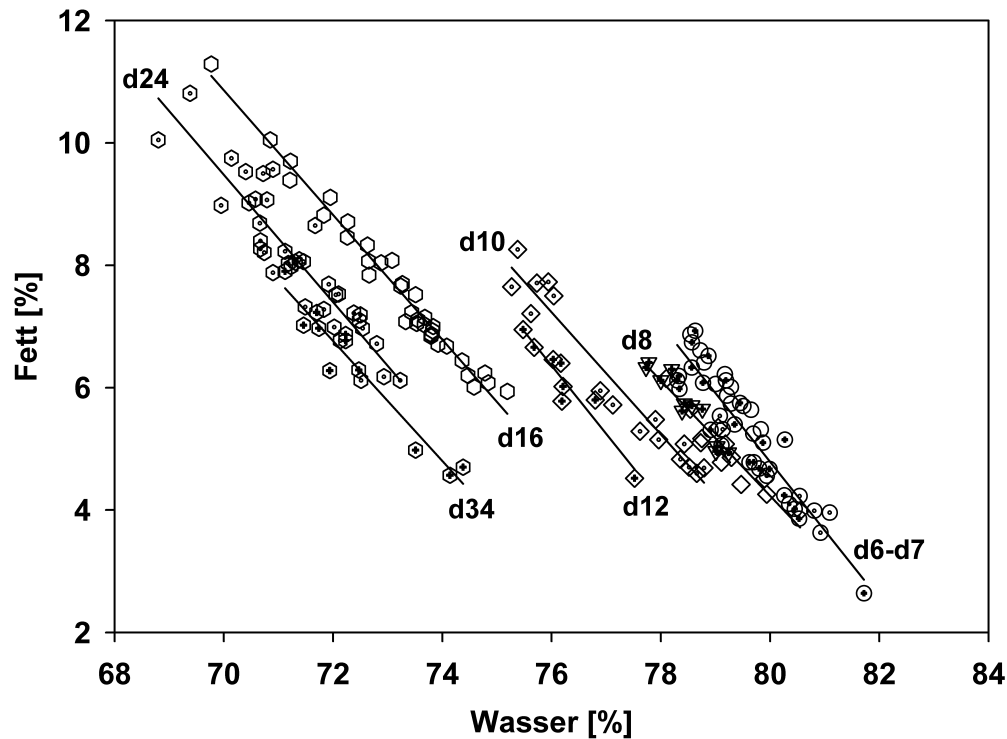


Abbildung 5: Korrelationen zwischen prozentualem Körperfettgehalt und prozentualem Körperwassergehalt von Wildtyp-Tieren verschiedener Altersstufen. Es ergeben sich Korrelationskoeffizienten zwischen  $-0,92$  und  $-0,99$  ohne systematische Änderungen mit dem Alter. Unterschiedliche Symbole kennzeichnen Tiere unterschiedlichen Alters (d6 bis d34).

### 3.2.2.2. Feuchtmasse und FFDM

Eine weitere sehr enge Beziehung, die als Kontrolle für die korrekte Bestimmung der Körperzusammensetzung im Einzelfall dienen kann, besteht innerhalb geschlossener Altersgruppen zwischen FFDM und Feuchtmasse (Meierfrankenfeld et al. 1996). Die hier erhobenen Daten zeigen, daß darüber hinaus auch über eine große Altersspanne von der 1. bis zur 5. Lebenswoche eine enge gemeinsame Korrelation zwischen diesen beiden Größen besteht (Abbildung 6,  $r = 0,99$ ).

### 3.2.2.3. Entwicklung des Körperfettgehaltes

Im Gegensatz zur sehr engen gemeinsamen Korrelation zwischen der Feuchtmasse und der FFDM zeigt sich eine deutlich größere Variabilität, wenn man den Zusammenhang der Körperfettmasse mit der Feuchtmasse über die gesamte untersuchte Altersspanne

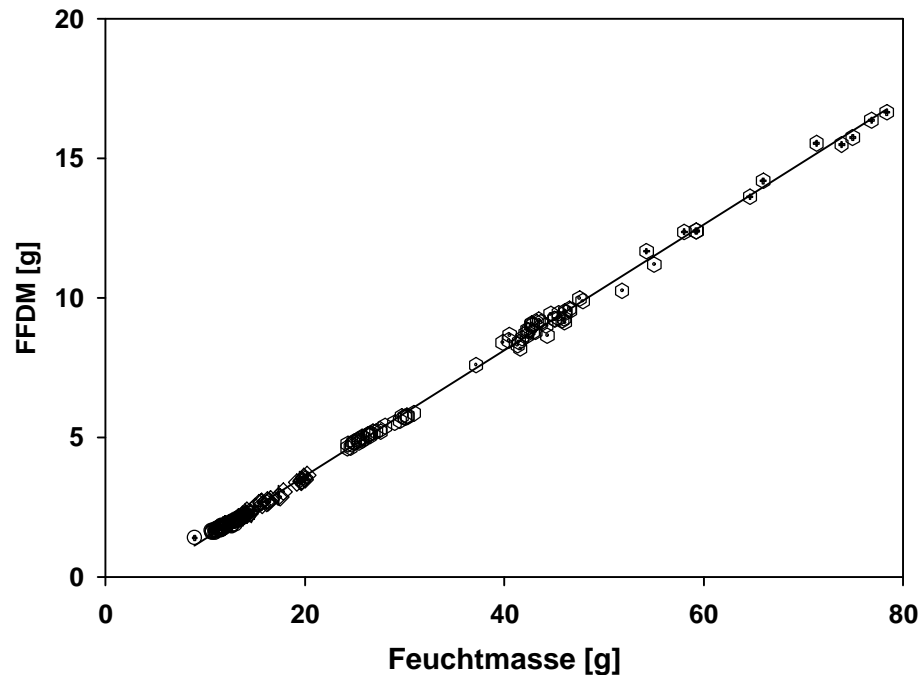


Abbildung 6: Korrelation ( $r = 0,99$ ) zwischen fettfreier Trockenmasse (FFDM) und Feuchtgewicht von Wildtyp-Tieren im Alter von 6 bis 34 Tagen. Unterschiedliche Symbole kennzeichnen Tiere unterschiedlichen Alters.

betrachtet (Abbildung 7). Zwar ergibt sich auch hier eine enge Korrelation ( $r = 0,95$ ) über den gesamten Bereich, jedoch weichen die Steigungen für die einzelnen Altersgruppen deutlich von der gemeinsamen Regressionsgeraden ab. Für die einzelnen Altersgruppen ergeben sich deutlich lockerere Korrelationen, die sich nicht systematisch mit dem Alter ändern.

Betrachtet man die Korrelation zwischen der Feuchtmasse und dem prozentualen Körperfettgehalt, zeigt sich eine noch größere Variabilität, so daß die Ermittlung einer gemeinsamen Regression über alle Altersgruppen nicht sinnvoll ist. Bei Ermittlung der Regressionsgeraden für die einzelnen Altersgruppen ist trotz der großen Variabilität mit zunehmendem Alter eine Abflachung der Geraden zu erkennen.

Die gewichteten Mittelwerte für die Gesamtkörperfettmasse zeigen für die untersuchten Altersstufen zwischen der 1. und 5. Lebenswoche einen Anstieg, der zwischen dem Alter von 12 und 24 Tagen am steilsten ist. Nach dem Absetzen flacht die Kurve deutlich ab und

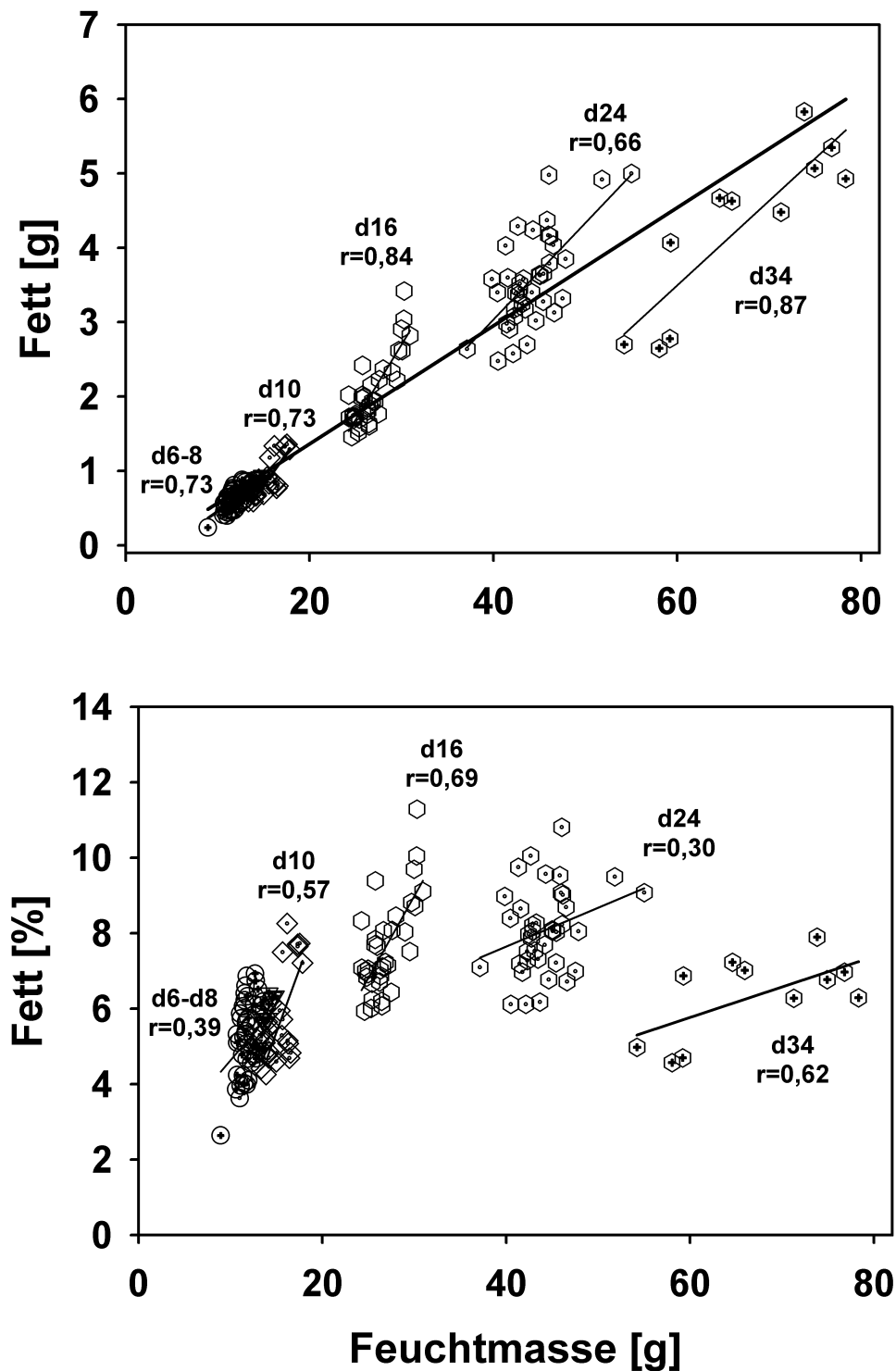


Abbildung 7: Korrelationen zwischen Körperfettmasse (oben) sowie prozentualem Körperfettgehalt (unten) und der Feuchtmasse von Wildtyp-Tieren der verschiedenen Altersstufen, die jeweiligen Korrelationskoeffizienten ( $r$ ) sind angegeben. Für die Altersgruppe 12 Tage war die Variation der Feuchtmasse zu gering, um eine sinnvolle Korrelation zu ermitteln. Für die gemeinsame Korrelation der Fettmasse mit der Feuchtmasse ergibt sich ein  $r = 0,95$ . Unterschiedliche Symbole kennzeichnen Tiere unterschiedlichen Alters (d6 bis d34).



die Streuung nimmt erheblich zu. Der prozentuale Körperfettgehalt steigt von der 1. bis zur 3. Lebenswoche von etwa 5 auf 8% an, nach dem Absetzen fällt der Fettgehalt dann weiter auf 6% ab (Abbildung 8).

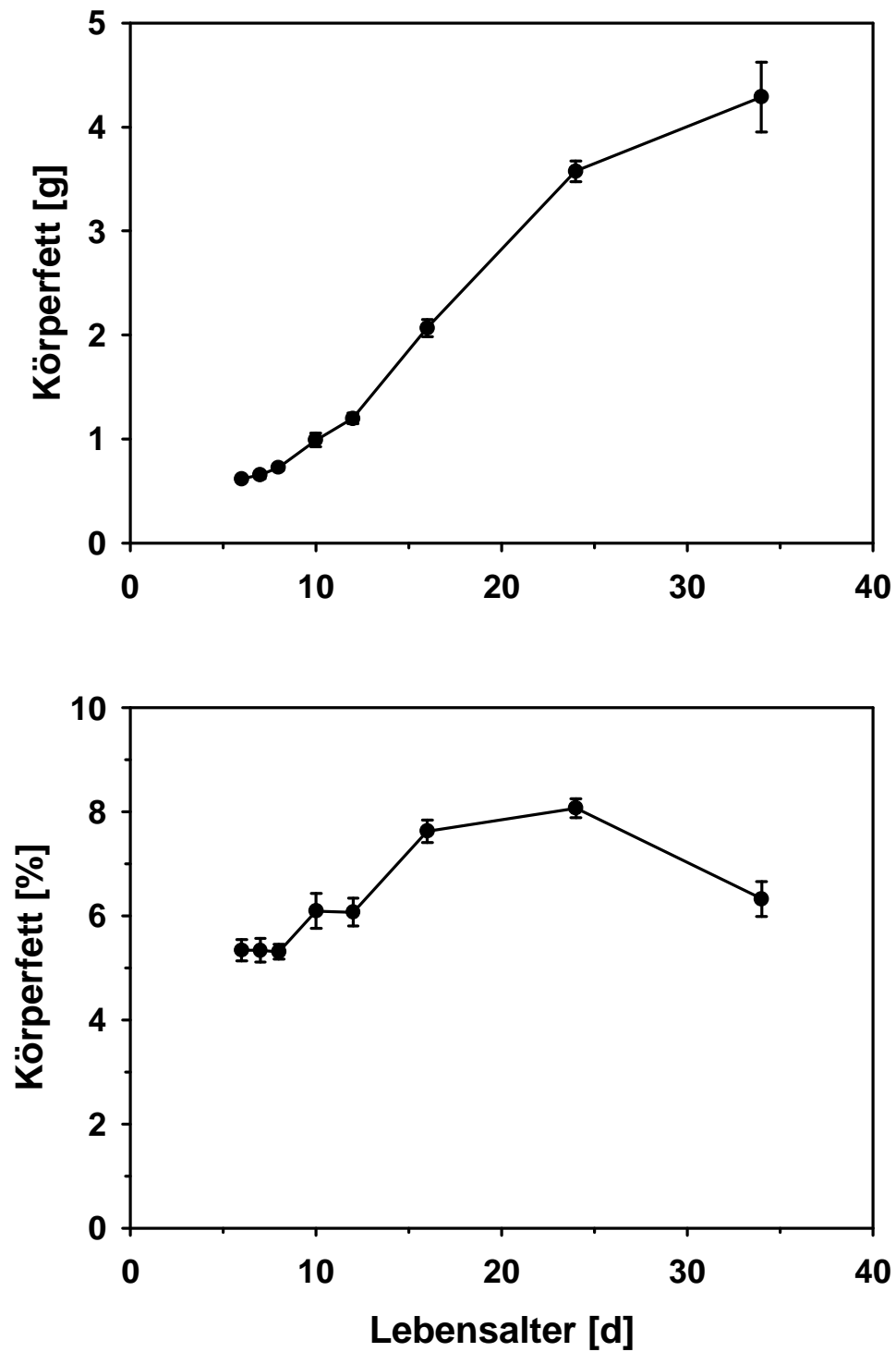


Abbildung 8: Zusammenhang zwischen den Mittelwerten  $\pm$  SEM der Körperfettmasse (oben), sowie des prozentualen Körperfettgehaltes (unten) und dem Alter von Wildtyp-Tieren.

### Schlußfolgerung

Aufgrund der im Entwicklungsverlauf zunehmenden Gesamtkörperfettmasse ist der prozentuale Körperfettgehalt eine geeignete Bezugsgröße für die Beurteilung der entwicklungsbedingten Veränderungen des Plasmaleptinspiegels über verschiedene Altersstufen hinweg.

#### 3.2.2.4. Entwicklung des Plasmaleptinspiegels

Obwohl sich die Gesamtkörperfettmasse mit zunehmendem Alter deutlich vergrößert, nimmt der Plasmaleptinspiegel zwischen der 1. und 5. Lebenswoche (Abbildung 9) ab. Auch ist die Variabilität im Alter zwischen 6 und 10 Tagen deutlich größer als bei den älteren Gruppen, jedoch weisen auch hier nur 11% der Tiere einen Plasmaleptinspiegel von mehr als 5 ng/ml auf. Setzt man den Plasmaleptinspiegel von Tag 6 bis Tag 34 in Beziehung zum prozentualen Körperfett, so zeigt sich, noch deutlicher als für die Gesamtkörperfettmasse, daß mit zunehmendem Alter die Streuung innerhalb der einzelnen Altersstufen kleiner wird. Es ist jedoch in den ersten beiden Lebenswochen keine zeitlich scharf definierte Leptinsurge zu erkennen, bei der gehäuft Werte über 5 ng/ml bzw. 1 ng/% Fettgehalt aufgetreten würden.

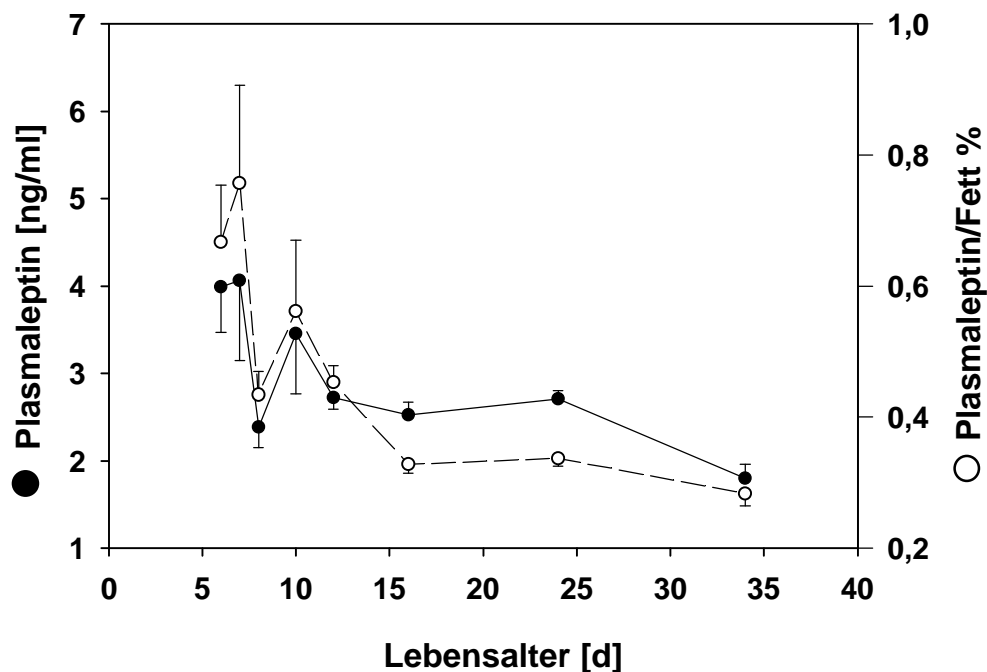


Abbildung 9: Zusammenhang zwischen den Mittelwerten  $\pm$  SEM des Plasmaleptinspiegels (linke Skala, ●) sowie des Plasmaleptinspiegels pro prozentualen Körperfettgehalt (rechte Skala, ○) und dem Lebensalter bei Wildtyp-Tieren.

### *Schlußfolgerung*

*Der Plasmaleptinspiegel von Wildtyp-Ratten nimmt während der ersten beiden Lebenswochen deutlich und danach langsamer ab. Dabei weist der Plasmaleptinspiegel in den ersten beiden Lebenswochen erheblich größere Schwankungen auf als in der 3. - 5. Lebenswoche. Im Alter von 10 Tagen kommt es zu keiner sprunghaften Veränderung des Plasmaleptinspiegels, der experimentelle Untersuchungen zu diesem Zeitpunkt beeinträchtigen würde.*

### **3.3. Regulation des Plasmaleptinspiegels und der *Lep*-Expression im WAT und BAT (Versuchsserie C)**

Aufgrund der Voruntersuchungen (Zhang et al. 1997, Olbort 1998) erschienen 10 Tage alte Ratten besonders geeignet, um die Regulationsmechanismen für die *Lep*-Expression im WAT und BAT, sowie für den Plasmaleptinspiegel näher zu analysieren. Dabei wurde insbesondere die Rolle der SAA und der Änderungen der zellulären Energieströme bzw. der Größe der Energiespeicher bei der Vermittlung der Feedbackregulation des Leptins auf seine eigene Expression in den Fettzellen intensiv untersucht.

Die Gendosis-Effekte auf den Plasmaleptinspiegel und den Körperfettgehalt von 10 Tage alten, normal von der Mutter aufgezogenen Ratten sind bereits ausführlich beschrieben worden (Zhang et al. 1997, Olbort 1998). In dieser Arbeit wurden diese Messungen zunächst wiederholt, um diese Größen auch in Beziehung zur Leptin-mRNA-Konzentration im WAT und BAT setzen zu können. So wurden die notwendigen Vergleichsdaten für die Untersuchung der Zusammenhänge zwischen diesen Größen erhoben bei den unter verschiedenen thermischen und nutritiven Bedingungen mit und ohne pharmakologische Beeinflussung durch Noradrenalingabe künstlich aufgezogenen Tieren, welche das Hauptziel dieser Arbeit darstellen. Die Methode der künstlichen Aufzucht ist für die Untersuchung dieser Zusammenhänge besonders geeignet, da sie sowohl die Einstellung konstanter Umweltbedingungen wie auch ihre experimentelle Manipulation ermöglicht und kontinuierliche Temperatur- und Stoffwechselfmessungen von Ratten im Säuglingsalter erlaubt.

### **3.3.1. Befunde bei normal aufgezogenen, unbehandelten Tieren**

#### **3.3.1.1. Auswirkungen der Gendosis auf den Plasmaleptinspiegel und den Körperfettgehalt**

Zum Vergleich des Plasmaleptinspiegels und des Körperfettgehaltes von 10 Tage alten, unbehandelten, normal aufgezogenen  $+/+$ ,  $+/fa$  und  $fa/fa$  Rattenwelpen unter intermittierender Kältebelastung wurden getrennte zweifaktorielle Varianzanalysen zum Vergleich von  $+/+$  und  $+/fa$  sowie  $+/fa$  und  $fa/fa$  Tieren durchgeführt, um Verzerrungen durch Würfe, die nur 2 Genotypen enthielten, auszuschließen. Die Wurfzugehörigkeit wurde als ein Faktor in die statistischen Auswertungen einbezogen, um die große Variabilität zwischen den Würfen zu berücksichtigen. Die resultierenden gewichteten Mittelwerte zeigt der obere Teil von Abbildung 10. Sowohl der Plasmaleptinspiegel als auch der prozentuale Körperfettgehalt der  $+/fa$  Tiere sind signifikant höher als bei den  $+/+$  Tieren ( $p < 0,05$ ) und bei beiden Parametern weisen die  $fa/fa$  Tiere gegenüber den  $+/fa$  Tieren ebenfalls signifikant höhere Werte auf ( $p < 0,001$ ). Dieser deutliche Gendosis-Effekt bleibt auch bei der Darstellung des Plasmaleptinspiegels pro Gramm Körperfett erhalten (nicht gezeigt).

#### **3.3.1.2. Auswirkungen der Gendosis auf die Leptin-mRNA-Konzentration im WAT und BAT**

Die in entsprechender Weise ausgewerteten Messungen der Leptin-mRNA-Konzentration [Leptin/Aktin] im WAT und BAT sind im unteren Teil von Abbildung 10 dargestellt. Der gewichtete Mittelwert für die unbehandelten, normal aufgezogenen  $+/fa$  Tiere ist ca. 1/3 höher als der ihrer  $+/+$  Wurfgeschwister ( $p < 0,001$ ). Wie auch schon frühere Untersuchungen gezeigt haben (Zhang et al. 1997), ist die Leptin-mRNA-Konzentration im WAT der  $fa/fa$  Tiere fast zweifach gegenüber der der  $+/fa$  Tiere erhöht ( $p < 0,001$ ), dies entspricht gegenüber den  $+/+$  Tieren fast schon einer dreifachen Erhöhung. Somit zeigt die Leptin-mRNA-Konzentration im WAT einen ähnlichen Gendosis-abhängigen Anstieg wie der Plasmaleptinspiegel und der Körperfettgehalt.

Betrachtet man bei denselben Tieren die Leptin-mRNA-Konzentration im BAT, fällt auf, daß diese ca. 50-80% niedriger ist als die im WAT. Wiederum ist die Leptin-mRNA-Konzentration der  $fa/fa$  Welpen gegenüber der der  $+/fa$  bzw.  $+/+$  Tiere um das 3,4-fache

( $p < 0,01$ ) erhöht (Abbildung 10). Im Kontrast zu dem Gendosis-abhängigen Anstieg der Leptin-mRNA-Konzentration im WAT derselben Tiere differiert diese im BAT der  $+/fa$  und  $+/+$  Welpen nicht ( $p = 0,29$ ).

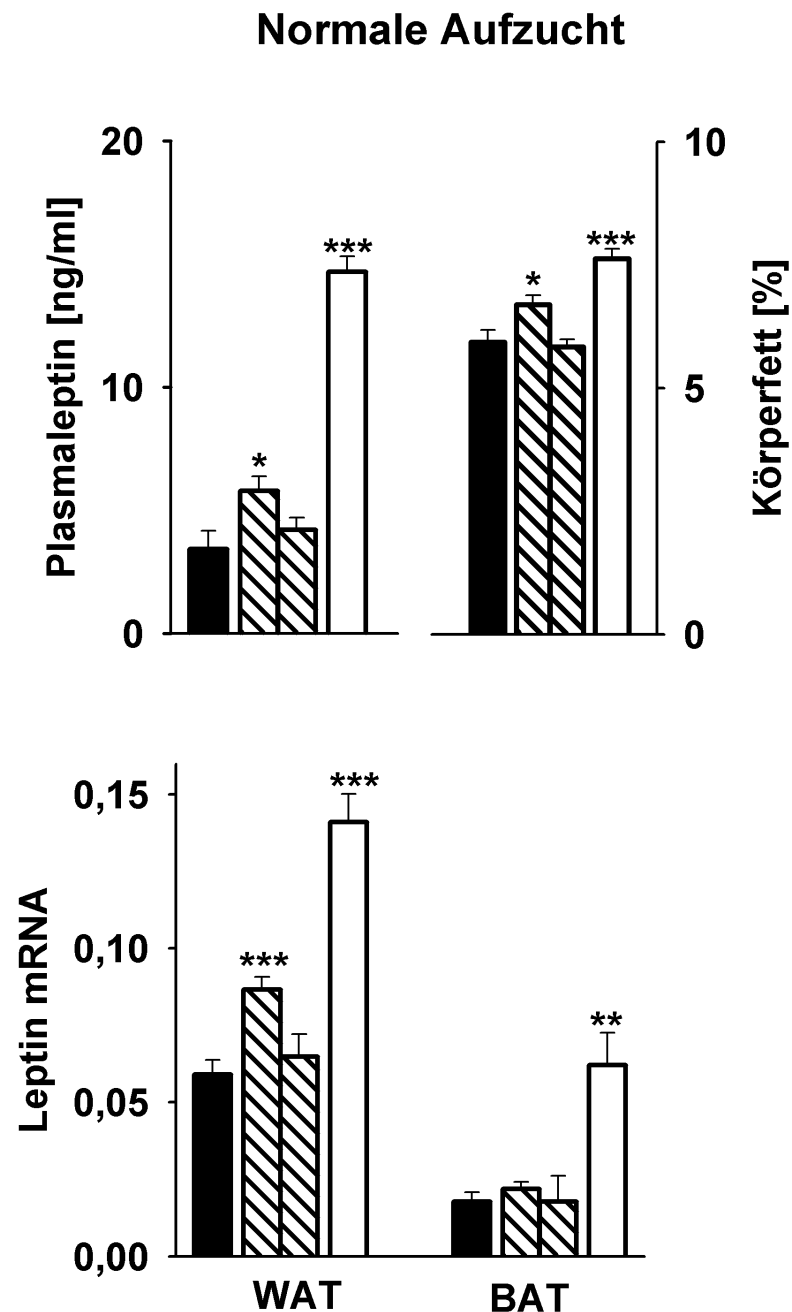


Abbildung 10: Gewichtete Mittelwerte  $\pm$  SEM des Plasmaleptinspiegels und des prozentualen Körperfettgehaltes (oben) sowie der WAT- und BAT-Leptin-mRNA-Konzentration [Leptin/Aktin] (unten) von 10 Tage alten, normal von der Mutter aufgezogenen Welpen. Die Daten von  $+/+$  (schwarz),  $+/-fa$  (gestreift) und  $fa/fa$  (weiß) Tieren wurden für die verschiedenen Versuchsbedingungen jeweils getrennt dargestellt. Die signifikanten Unterschiede sind gekennzeichnet (\*\*\*) =  $p < 0,001$ , \*\* =  $p < 0,01$ , \* =  $p < 0,05$ ).

### 3.3.1.3. Zusammenhang zwischen Plasmaleptinspiegel und der Leptin-mRNA-Konzentration im WAT und BAT

Aufgrund des heterozygoten Unterschiedes, der im WAT gefunden wurde, und der Tatsache, daß die Leptin-mRNA-Konzentration im WAT 2- bis 3-fach höher ist als im BAT derselben Tiere, ist das Vorhandensein eines heterozygoten Unterschiedes im Plasmaleptinspiegel auf den ersten Blick nicht überraschend. Die Daten der Abbildung 10 geben jedoch keinen Hinweis darauf, welcher Zusammenhang zwischen der Leptin-mRNA-Konzentration in den beiden Leptin-sezernierenden Geweben, dem WAT oder dem BAT, und der Plasmaleptinkonzentration besteht. Die Analyse mittels multipler Regressionen von Daten von Tieren, die im normalen Nest aufgezogen wurden und bei denen alle 3 Parameter gleichzeitig bestimmt wurden ( $n = 14$ , nur  $+/+$  und  $+/fa$  Tiere), ergab unerwartet, daß der Plasmaleptinspiegel enger mit der mRNA-Konzentration im BAT als im WAT korrelierte. Mit  $R^2 = 0,74$  erklärte die Leptin-mRNA-Konzentration im BAT bei einem standardisierten Korrelationskoeffizienten von  $\beta = 0,70$  ( $p = 0,001$ ) etwa 65%, die Leptin-mRNA-Konzentration im WAT bei einem  $\beta = 0,31$  ( $p = 0,09$ ) jedoch nur 8,5% der Variabilität des Plasmaleptinspiegels.

#### Schlußfolgerung

*Die dargestellten Ergebnisse lassen vermuten, daß das BAT trotz seiner niedrigeren relativen Leptin-mRNA-Konzentration (Leptin/Aktin) im Vergleich zum WAT bei 10 Tage alten Tieren eine Hauptquelle des zirkulierenden Leptins ist. Dies könnte damit zusammenhängen, daß in diesem Alter die Masse des BAT noch wesentlich größer ist als die des WAT. Da der homozygote Lepr-Defekt die Leptin-mRNA-Konzentration im BAT und WAT relativ zu den  $+/+$  Tieren erhöht, wohingegen der heterozygote Lepr-Defekt nur die Leptin-mRNA-Konzentration im WAT erhöht, kann man schließen, daß der zugrunde liegende Mechanismus der LEPR-vermittelten Suppression der Lep-Expression im WAT und BAT unterschiedlich ist.*

*Zwischen den  $+/+$ ,  $+/fa$  und  $fa/fa$  Tieren bestehen keine signifikanten Unterschiede in den mRNA-Konzentrationen des Fettsäure-bindenden Proteins  $\alpha P2$  und des Uncoupling-Proteins (UCP1) im BAT, wie von unseren amerikanischen Kooperationspartnern Yiyang Zhang und Rudolph Leibel festgestellt wurde (Zhang et al. 2001). Diese hier nicht dargestellten Befunde stützen die Schlußfolgerung, daß es sich bei der von uns*

*beobachteten Erhöhung der Leptin-mRNA-Konzentration der fa/fa Tiere um eine spezifische Veränderung handelt. Offenbar bewirkt das Vorhandensein des Wildtyp-Allels eine Suppression der Lep-Expression, wobei für die Suppression im BAT das Vorhandensein nur eines intakten Rezeptor-Allels für die Maximalwirkung ausreichend ist.*

### **3.3.2. Auswirkung von experimentellen Manipulationen der SAA und der Nettoenergiezufuhr auf den Plasmaleptinspiegel, den Körperfettgehalt und die Leptin-mRNA-Konzentration im BAT und WAT von künstlich aufgezogenen Tieren**

#### **3.3.2.1. Manipulation der Aufzuchtbedingungen**

Bei der normalen Aufzucht von Rattenwelpen durch die Mutter in den zur Bestimmung des Plasmaleptinspiegels und der Körperzusammensetzung verwendeten Würfen (#1-7), kommt es zu einer intermittierenden Kältebelastung der Jungtiere, bedingt durch die periodische Abwesenheit der Mutter vom Nest (Schmidt et al. 1986 b). Es ist bekannt, daß die thermoneutrale Aufzucht von Ratten im Altersabschnitt von 4 bis 16 Tagen den durch das SNS vermittelten Energieverbrauch minimiert und die Unterschiede im Energiestoffwechsel zwischen den fa/fa Tieren und ihren +/-fa bzw. ++ Wurfgeschwistern eliminiert, die bei Aufzucht unter Kältebelastung auftreten (Markewicz et al. 1993, Kaul et al. 1990). Eine zusätzliche Noradrenalin-Behandlung imitiert dagegen eine Erhöhung der Aktivität des SNS und damit des Energieverbrauchs und gleicht den Energiestoffwechsel der fa/fa und +/-fa Tiere auf einem hohen Niveau aneinander an (Körtner et al. 1994, Meierfrankenfeld et al. 1996).

Um den Einfluß der künstlichen Aufzucht zu beurteilen und adäquate Vergleichsdaten für die Manipulation einzelner thermischer und nutritiver Faktoren innerhalb der künstlichen Aufzucht zu erzeugen, wurden zwei Würfe (# 8+9) für 2 Tage in der künstlichen Aufzucht einer ähnlichen moderaten Kältebelastung ausgesetzt, wie sie im Tagesmittel bei den normal von der Mutter aufgezogenen Tieren auftritt (Nüßlein 1992, Markewicz et al. 1993). Um im Vergleich zur moderaten Kältebelastung Veränderungen in der SAA herbeizuführen, wurde bei anderen Würfen die Umgebungstemperatur für 2 (#10-11) oder 6 Tage (#12-16) auf thermoneutrale Bedingungen eingestellt. In den Würfen #14-16 wurde zusätzlich eine medikamentöse Noradrenalin-Dauerbehandlung durchgeführt, um die

Sympathikusaktivierung zu imitieren. Normale Aufzucht und 2 Tage dauernde künstliche Aufzuchten wurden mit Tieren aller drei Genotypen durchgeführt, bei den 6 Tage dauernden künstlichen Aufzuchten konzentrierten wir uns auf den Unterschied zwischen  $+/fa$  und  $fa/fa$  Tieren.

Wie aus früheren Untersuchungen bekannt ist, ist die MS-MR eng mit der SAA im BAT von Tieren in diesem Alter korreliert (Redlin et al. 1992, Körtner et al. 1993, 1994, Döring et al. 1994). Der obere Teil von Abbildung 11 zeigt beispielhaft für die letzten 24 h der künstlichen Aufzucht, wie sich die experimentellen Manipulationen auf die MS-MR, als Indikator für die SAA, auswirken. Aufzucht unter thermoneutralen Bedingungen führt zu einer starken Erniedrigung der MS-MR von  $+/fa$  und  $+/+$  Tieren relativ zu Welpen des gleichen Genotyps, die unter Kältebelastung aufgezogen wurden. Die MS-MR der  $fa/fa$  Tiere ist dagegen bereits unter Kältebelastung so niedrig wie die der  $+/+$  und  $+/fa$  Tiere unter thermoneutralen Bedingungen, da die  $fa/fa$  Tiere im Gegensatz zu ihren  $+/+$  und  $+/fa$  Wurfgeschwistern unter Kältebelastung ihre Kälteabwehr nicht aktivieren und hypotherm sind (Markewicz et al. 1993, Kaul et al. 1990). Die Aufzucht von  $+/+$ ,  $+/fa$  und  $fa/fa$  Tieren unter thermoneutralen Bedingungen gleicht also die MS-MR der Tiere der drei Genotypen auf einem sehr niedrigen Niveau einander an. Die zusätzliche Noradrenalingabe über die zugeführte Milch erhöht dagegen die MS-MR von 1-2 Wochen alten  $+/+$ ,  $+/fa$  und  $fa/fa$  Tieren gleichermaßen (Körtner et al. 1993). Die Dosis wurde in der vorliegenden Untersuchung so gewählt, daß die MS-MR der mit Noradrenalin behandelten Tiere in den letzten 24 h des Experimentes ca. 100% über dem Niveau der Tiere lag, die unter thermoneutralen Bedingungen ohne Noradrenalingabe aufgezogen wurden. Zudem wurde durch eine Manipulation der Nettoenergiezufuhr ein deutlich niedrigerer Körperfettgehalt bei einem der drei mit Noradrenalin behandelten Würfe provoziert (siehe unten).

Der untere Teil von Abbildung 11 zeigt die akute Nettoenergiezufuhr für die letzten 24 h des Experiments, d.h. die Differenz zwischen der mit der Milch zugeführten Energie und der verbrauchten Energie in kJ. Deutlich ist zu erkennen, daß bei den zwei unter Kältebelastung aufgezogenen Würfen die Nettoenergiezufuhr der  $fa/fa$  Tiere aufgrund ihrer gedrosselten Wärmeproduktion bei gleicher Milchversorgung erheblich höher liegt als die ihrer  $+/+$  und  $+/fa$  Wurfgeschwister, die sich nicht unterscheidet. Bei den thermoneutral gehaltenen Würfen liegt dagegen die Nettoenergiezufuhr von 34 der 35  $fa/fa$  Tiere im



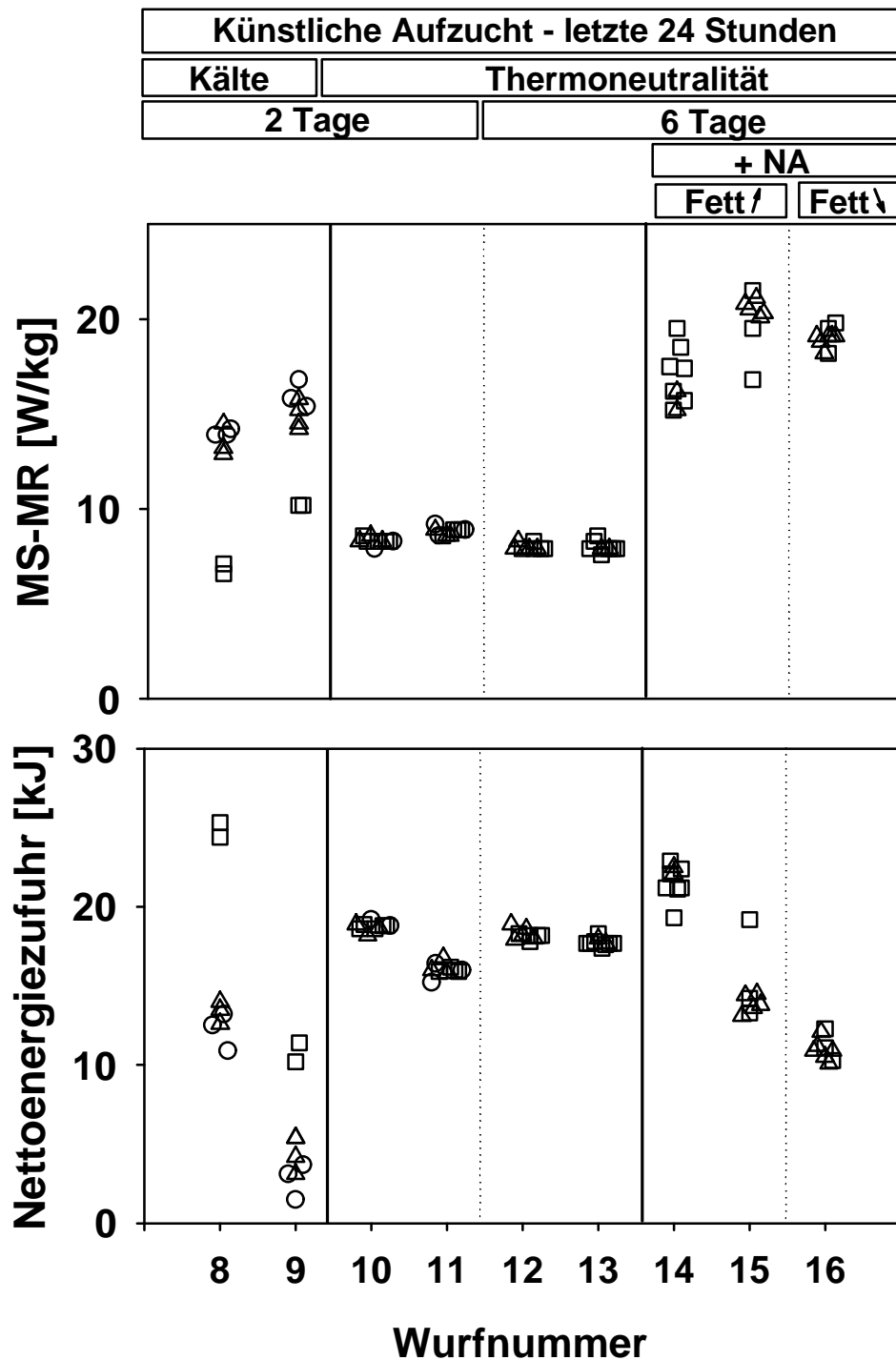


Abbildung 11: Massenspezifische Metabolische Rate (MS-MR, oben) und Nettoenergiezufuhr (Differenz zwischen der mit der Milch zugeführten Energie und der verbrauchten Energie, unten) in den letzten 24 h der künstlichen Aufzucht, getrennt nach Wurf- und Versuchsgruppen-Zugehörigkeit. Bei den Würfen mit Noradrenalin-Behandlung (NA) wurde zwischen solchen mit hoher (Fett /) bzw. niedriger (Fett \) Körperfettmasse am Versuchsende unterschieden (vgl. Abb. 12 oben). Genotypen +/+ (○), +/fa (△) und fa/fa (□).

Bereich ihrer Wurfgeschwister. Wurf #16 weist in der Gruppe der mit Noradrenalin behandelten Tiere die niedrigste Nettoenergiezufuhr über den gesamten Versuch auf. Der Unterschied in der akuten Nettoenergiezufuhr der letzten 24 h zwischen Wurf #14 und 15 ist zwar größer als zwischen Wurf #15 und 16, entscheidend für den Körperfettgehalt war aber die Nettoenergiezufuhr über den gesamten Versuch und so wurde ein deutlich höherer Körperfettgehalt von Wurf #14 und 15 gegenüber Wurf #16 erreicht.

Vergleicht man die normal mit den künstlich aufgezogenen Welpen, zeigt ein Vergleich der Gesamtkörperfettmasse (Abbildung 12 oben), daß diese über einen weiten Bereich in Abhängigkeit von Wurf, Genotyp und Aufzuchtbedingungen variiert. Deutlich ist zu erkennen, daß in der Gruppe der mit Noradrenalin behandelten Tiere Wurf #16 einen erheblich niedrigeren Gesamtkörperfettgehalt als die Würfe #14 und 15 aufweist. Dies wurde durch die experimentelle Manipulation der Differenz zwischen zugeführter Energie (Milchflußrate) und verbrauchter Energie (MR) erzeugt. D.h. bei ähnlich hoher SAA wurde bei den Würfen #14 und 15 durch eine hohe Nettoenergiezufuhr der Gesamtkörperfettgehalt im Normalbereich gehalten, während Wurf #16 durch eine geringe Nettoenergiezufuhr auf einen niedrigeren Gesamtkörperfettgehalt eingestellt wurde. Diese nutritive Manipulation erlaubt die experimentelle Differenzierung von Effekten auf die *Lep*-Expression und den Plasmaleptinspiegel, die von der SAA bzw. vom Lipidgehalt und/oder den Energieströmen in den Adipozyten ausgehen könnten.

### **3.3.2.2. Unterschiede im Wachstum von normal und künstlich aufgezogenen Tieren**

Einen Vergleich der FFDM aller Tiere, als Maß für das Wachstum der fettfreien Körpersubstanz, zeigt Abbildung 12 (unten). Sehr deutlich ist dabei die erheblich kleinere FFDM der Tiere aus den Würfen #12-16 zu erkennen, die bereits ab einem Alter von 4 Tagen künstlich aufgezogen wurden, im Vergleich zu den Tieren, bei denen die künstliche Aufzucht erst im Alter von 8 Tagen begann. Aber auch bei drei der vier nur für 2 Tage künstlich aufgezogenen Würfe (#9-11) fällt eine deutlich geringere Variabilität verbunden mit einer etwas niedrigeren FFDM im Vergleich zu den normal aufgezogenen Tieren ins Auge. Nur einer der beiden unter moderater Kältebelastung aufgezogenen Würfe (#8) wies eine FFDM auf, die im Bereich der normal aufgezogenen Tiere lag, und deutlich über der der anderen über 2 Tage künstlich aufgezogenen Würfe (#9-11) lag. Dies könnte vielleicht darauf beruhen, daß dieser Wurf einen Tag älter war als die anderen Tiere. Die Daten von diesem Wurf wurden deshalb nur bei der Darstellung der Einzelwerte

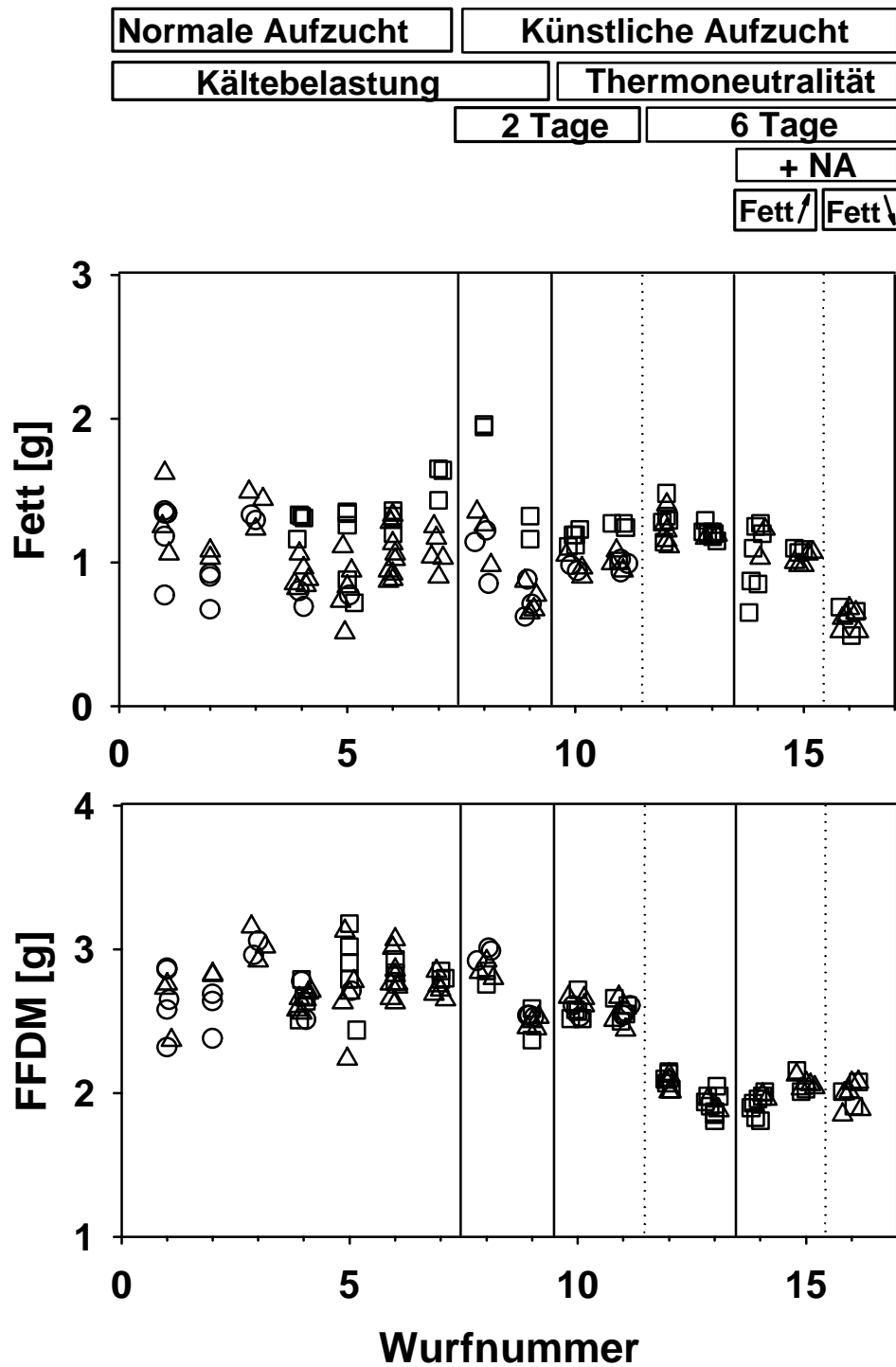


Abbildung 12: Körperfettmasse (oben) und fettfreie Trockenmasse (FFDM) (unten) von 10 Tage alten Tieren, getrennt nach Wurf- und Versuchsgruppen-Zugehörigkeit. Bei den Würfen mit Noradrenalin-Behandlung (NA) wurde zwischen solchen mit hoher (Fett ↗) bzw. niedriger (Fett ↘) Körperfettmasse am Versuchsende unterschieden. Genotypen +/+ (○), +/fa (△) und fa/fa (□).

berücksichtigt, sie fanden jedoch keine Berücksichtigung in statistischen Auswertungen (ANOVA und Regressionsanalysen). Aufgrund der dargestellten Größenunterschiede zwischen den Versuchsgruppen wurde zum Vergleich der Fettspeicher im Folgenden der auf die Körpermasse bezogene prozentuale Körperfettgehalt herangezogen, um eine Verzerrung der Befunde durch die Größenunterschiede auszuschließen.

### **3.3.2.3. Vergleich zwischen normal und künstlich unter moderater Kältebelastung aufgezogenen Tieren**

Aufgrund der geringen statistisch auswertbaren Tierzahl in der Gruppe der künstlich unter Kältebelastung aufgezogenen Tiere (Wurf #9), werden im oberen Diagramm der Abbildung 13 zunächst die Einzelwerte des Plasmaleptinspiegels dargestellt. Das untere Diagramm zeigt den prozentualen Körperfettgehalt derselben Tiere als Bezugsgröße. Dadurch wird deutlich, daß bei künstlicher Aufzucht unter Kältebelastung bei den *fa/fa* Tieren mindestens ebenso ausgeprägte Unterschiede im Plasmaleptinspiegel und im prozentualen Körperfettgehalt auftreten, wie bei den normal aufgezogenen Würfen (vgl. #8-9 mit #1-7). Die *fa/fa* Tiere liegen im oberen Abschnitt des Meßbereichs und haben einen wesentlich höheren Plasmaleptinspiegel als ihre *+/+* und *+/fa* Wurfgeschwister. Dies zeigt, daß die künstliche Aufzucht an sich die abnormal hohen Plasmaleptinspiegel der *fa/fa* Tiere nicht eliminiert. 82% der *fa/fa* Welpen, aber nur 9% ihrer *+/+* und *+/fa* Wurfgeschwister weisen unter moderater Kältebelastung, sowohl bei normaler wie künstlicher Aufzucht, Plasmaleptinspiegel von über 10 ng/ml auf. Auch bei der Korrektur gegen den Körperfettgehalt bleibt ein deutlicher Gendosis-abhängiger Unterschied im Plasmaleptinspiegel bestehen (nicht gezeigt).

Abbildung 14 A zeigt die unter Berücksichtigung der Wurfunterschiede gewichteten Mittelwerte des Plasmaleptinspiegels und die statistische Signifikanz der Unterschiede zwischen Tieren der verschiedenen Genotypen in jeder der Versuchsgruppen. Es wurde hier, genauso wie bei den anderen in Abbildung 14 dargestellten Variablen, aufgrund der großen Variabilität zwischen den Würfen jedoch kein statistischer Vergleich über die Gruppengrenzen hinweg durchgeführt. Die Plasmaleptinspiegel der künstlich unter Kältebelastung aufgezogenen *fa/fa* Tiere sind ebenso wie die der normal aufgezogenen *fa/fa* Tiere deutlich höher ( $p < 0,001$ ) als die der jeweiligen *+/+* und *+/fa* Wurfgeschwister. Im Gegensatz zur normalen Aufzucht unter moderater Kältebelastung weisen die Werte

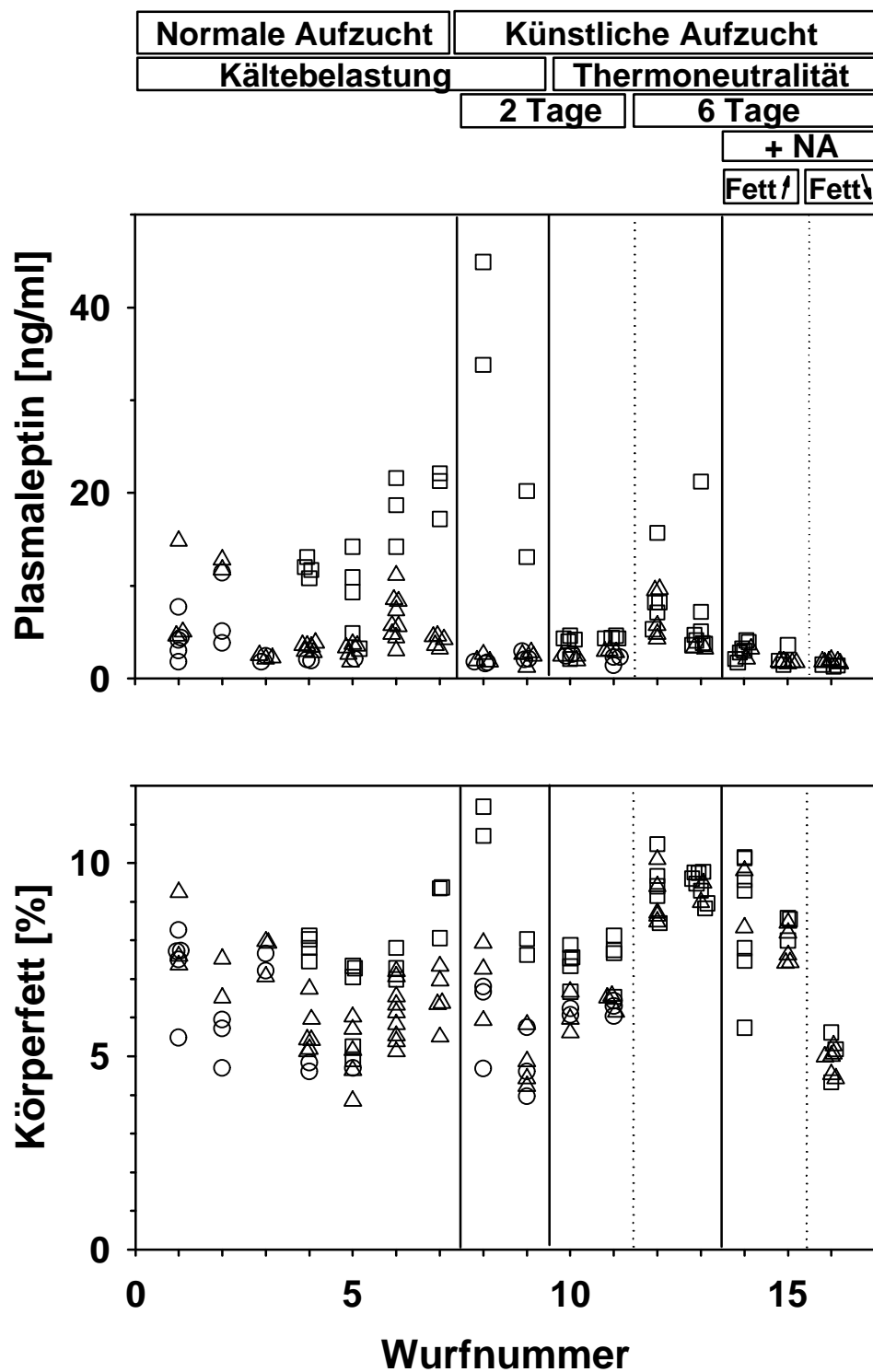


Abbildung 13: Plasmaleptinspiegel (oben) und prozentualer Körperfettgehalt (unten) bei 10 Tage alten Tieren getrennt nach Wurf- und Versuchsgruppen-Zugehörigkeit. Bei den Würfen mit Noradrenalin-Behandlung (NA) wurde zwischen solchen mit hoher (Fett ↗) bzw. niedriger (Fett ↘) Körperfettmasse am Versuchsende unterschieden. Genotypen  $+/+$  (○),  $+/fa$  (△) und  $fa/fa$  (□).

der künstlich aufgezogenen  $+/+$  und  $+/fa$  Tiere jedoch keinen signifikanten Unterschied voneinander auf (Abbildung 14 A). Die Gendosis-abhängigen Unterschiede im Körperfettgehalt (Abbildung 14 B) entsprechen denen im Plasmaleptinspiegel.

Die Leptin-mRNA-Konzentration im WAT ist bei künstlicher Aufzucht unter moderater Kältebelastung generell niedrigerer und die Streuung bei  $+/+$  und  $+/fa$  Tieren größer als unter normalen Aufzuchtbedingungen (Abbildung 14 C). Die künstlich aufgezogenen Tiere zeigen aber bei Kältebelastung tendenziell die gleichen Gendosis-abhängigen Unterschiede der *Lep*-Expression im WAT wie die normal aufgezogenen Welpen, obwohl die Tierzahl in diesem Fall zu klein ist, um angesichts der großen Streuung der Daten noch statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Genotypen zu erhalten (Abbildung 14 C).

Die Leptin-mRNA-Konzentration im BAT ist wesentlich niedriger als die im WAT derselben Tiere (Abbildung 14 D). Die Unterschiede zwischen den Genotypen entsprechen denen bei den normal aufgezogenen Tieren, d.h. die Leptin-mRNA-Konzentration im BAT der *fa/fa* Welpen ( $p < 0,001$ ) ist um ein vielfaches höher als die ihrer  $+/fa$  und  $+/+$  Wurfgeschwister, deren Werte nicht differieren.

### *Schlußfolgerung*

*Der Vergleich zwischen unter moderater Kältebelastung normal und künstlich aufgezogenen, 10 Tage alten Rattenwelpen zeigt, daß die stark erhöhten Werte des Plasmaleptinspiegels, sowie der Leptin-mRNA-Konzentration im WAT und BAT der *fa/fa* Tiere gegenüber denen ihrer  $+/+$  und  $+/fa$  Wurfgeschwister nicht durch die künstliche Aufzucht an sich verkleinert werden.*

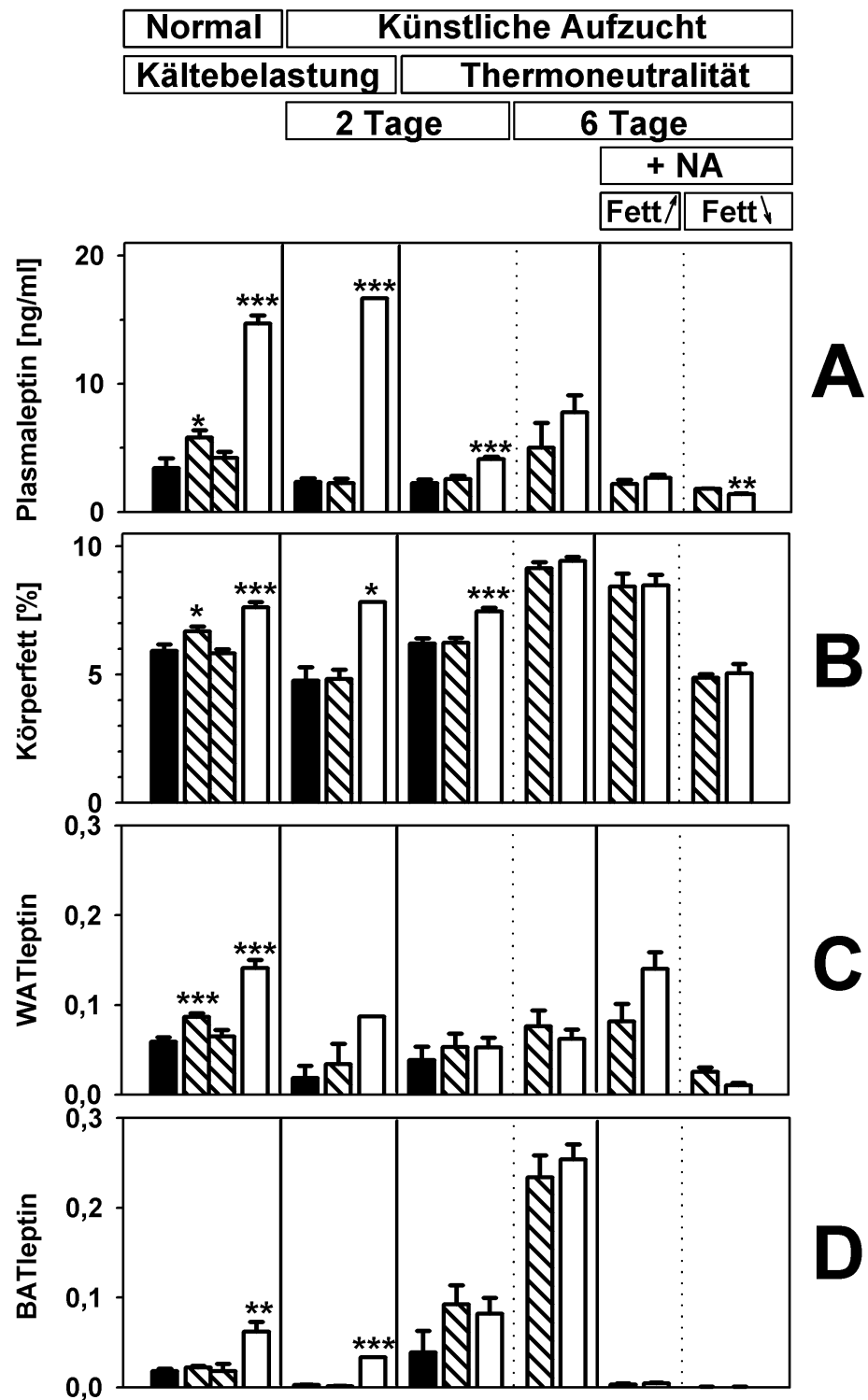


Abbildung 14: Gewichtete Mittelwerte  $\pm$  SEM des Plasmaleptinspiegels (A), des prozentualen Körperfettgehaltes (B), der Leptin-mRNA-Konzentration [Leptin/Aktin] im WAT (C) und im BAT (D) von 10 Tage alten Welpen. Die Daten der  $+/+$  (schwarz),  $+/-$  (gestreift) und  $fa/fa$  (weiß) Tiere wurden für die verschiedenen Versuchsbedingungen jeweils getrennt dargestellt und soweit erforderlich auch getrennt für die  $+/-$  Tiere mit  $+/+$  bzw. mit  $fa/fa$  Wurfgeschwistern. Die signifikanten Unterschiede sind gekennzeichnet (\*\*\*) =  $p < 0,001$ , \*\* =  $p < 0,01$ , \* =  $p < 0,05$ ). Bei den Würfen mit Noradrenalin-Behandlung (NA) wurde zwischen solchen mit hoher (Fett ↗) bzw. niedriger (Fett ↘) Körperfettmasse am Versuchsende unterschieden.

### 3.3.2.4. Einfluß der SAA und der Nettoenergiezufuhr auf die Plasmaleptinkonzentration und den Gesamtkörperfettgehalt

#### 3.3.2.4.1. Thermoneutrale Aufzucht

Bereits bei 2-tägiger Verminderung der sympathisch vermittelten Wärmeproduktion durch Aufzucht unter thermoneutralen Bedingungen kommt es zu einem starken Abfall der Plasmaleptinkonzentration der *fa/fa* Welpen auf weniger als 1/3 des Niveaus unter moderater Kältebelastung (Abbildung 14 A, mittlerer Teil). Im Durchschnitt lagen die Plasmaleptinkonzentrationen der *fa/fa* Tiere bei thermoneutraler Aufzucht nur noch 30%, jedoch immer noch signifikant ( $p < 0,001$ ) über denen ihrer  $+/+$  und  $+/fa$  Wurfgeschwister, deren Werte sich kaum von den künstlich unter Kältebelastung aufgezogenen Tieren gleichen Genotyps unterschieden, während die *fa/fa* Tiere unter Kältebelastung ca. 5-fach höhere Plasmaleptinwerte als ihre Wurfgeschwister aufwiesen. Der Körperfettgehalt der *fa/fa* Tiere ist nach dieser kurzen Zeit unverändert hoch ( $p < 0,001$  für den Genotypunterschied), so daß der Plasmaleptinspiegel jetzt nicht mehr überproportional wie unter Kältebelastung erhöht ist, sondern nur noch proportional zum höheren Körperfettgehalt der *fa/fa* Tiere.

Thermoneutrale Aufzucht über 6 Tage, vom postnatalen Tag 4 bis 10/11, hielt den Energieverbrauch von  $+/fa$  und *fa/fa* Welpen chronisch auf einem sehr niedrigen Niveau. Unter diesen Bedingungen steigt der prozentuale Körperfettgehalt der  $+/fa$  Tiere stärker an als der ihrer *fa/fa* Wurfgeschwister, so daß sich die Werte nicht mehr unterscheiden (Abbildung 14 B). Im Gegensatz zu den nur für 2 Tage unter thermoneutralen Bedingungen aufgezogenen Welpen sind die Plasmaleptinspiegel der über 6 Tage unter diesen Bedingungen gehaltenen Tiere sowohl bei  $+/fa$  wie *fa/fa* Tieren entsprechend zu dem gestiegenen Gesamtkörperfettgehalt erhöht (vgl. die beiden mittleren Versuchsgruppen in Abbildung 14 A). Die Betrachtung der Einzelwerte (vgl. Abbildung 13 A) zeigt, daß 10 der 12 über 6 Tage thermoneutral gehaltenen *fa/fa* Welpen einen Plasmaleptinspiegel in derselben Größenordnung wie ihre  $+/fa$  Wurfgeschwister aufweisen, und unterstreicht so das Fehlen eines signifikanten Unterschiedes in den gewichteten Mittelwerten von  $+/fa$  und *fa/fa* Tieren (Abbildung 14 A). Im Vergleich zu den normal und künstlich aufgezogenen Tieren unter moderater Kältebelastung wiesen dementsprechend nur 9% von 22 *fa/fa* Welpen unter 2- und 6- tägigen thermoneutralen



Bedingungen Plasmaleptinwerte von über 10 ng/ml auf, während diese unter moderater Kältebelastung insgesamt bei 82% der *fa/fa* Tiere auftraten.

### *Schlußfolgerung*

*Die Erniedrigung des Plasmaleptinspiegels der thermoneutral aufgezogenen *fa/fa* Tiere war unerwartet, weil in anderen Untersuchungen die Aktivierung des SNS mit einer Erniedrigung der Plasmaleptinkonzentration von Wildtyp-Mäusen und Ratten einherging (Moinat et al. 1995, Trayhurn et al. 1996, Evans et al. 1999). Deshalb hätte man erwartet, daß eine Minimierung der SAA durch thermoneutrale Aufzucht unmittelbar und nicht erst nach Erhöhung des Körperfettgehaltes eine Erhöhung der Plasmaleptinspiegel der *+/+* und *+/fa* Wurfgeschwister zur Folge haben würde und hätte keinesfalls mit einem Abfall der Werte der *fa/fa* Tiere gerechnet. Die künstliche Aufzucht unter thermoneutralen Bedingungen gleicht also nicht nur den Energieverbrauch von *+/fa* und *fa/fa* Tieren auf einem minimalen Niveau an, sondern eliminiert auch offensichtlich Faktoren, die für die überhöhten Plasmaleptinspiegel von *fa/fa* Tieren, die normal oder künstlich unter Kältebelastung aufgezogenen werden, verantwortlich sind.*

### **3.3.2.4.2. Noradrenalin-Behandlung**

Durch einen Zusatz von Noradrenalin zur Milch wird eine erhöhte Aktivität des SNS imitiert und damit der tägliche Energieverbrauch der *+/+*, *+/fa* und *fa/fa* Welpen vergrößert. Die Noradrenalin-Zufuhr wurde stufenweise so eingestellt, daß das tägliche Mittel der MS-MR ab dem postnatalen Tag 5 schrittweise vom Thermoneutralniveau bis auf 100% über dieses Niveau am letzten Versuchstag anstieg. Im Mittel über das gesamte Experiment wurde so ein Anstieg der MS-MR ca. 60% über das Thermoneutralniveau erzielt. Die adrenerge Stimulation durch Noradrenalin-Behandlung senkt die Plasmaleptinspiegel der *fa/fa* Tiere drastisch und gleicht die Plasmaleptinwerte von *fa/fa* und *+/fa* Tieren aneinander an, ohne daß es in der Gruppe mit hohem Fettgehalt zu einer deutlichen Erniedrigung des Plasmaleptinspiegels der *+/fa* Tiere im Vergleich zu künstlich unter Kältebelastung aufgezogenen Tieren gleichen Genotyps kommt (Abbildung 14 A, rechter Teil). Im Vergleich zu den über 6 d unter thermoneutralen Bedingungen aufgezogenen *+/fa* Tieren mit ungefähr gleich hohem Fettgehalt (Abbildung 14 B) ist der Plasmaleptinspiegel jedoch deutlich erniedrigt. Der Gesamtkörperfettgehalt (Abbildung 14 B) der *fa/fa* und *+/fa* Welpen zeigt in beiden Gruppen keinen Gendosis-Effekt, aber der

Körperfettgehalt in der Gruppe mit der niedrigen Nettoenergiezufuhr (Wurf #16) ist bei beiden Genotypen nur halb so groß wie bei hoher Nettoenergiezufuhr (Wurf #14-15). In der Gruppe mit niedrigem Körperfettgehalt sind die Plasmaleptinspiegel der *fa/fa* Tiere sogar signifikant niedriger als die der *+/fa* Tiere.

#### *Schlußfolgerung*

*Es konnte gezeigt werden, daß es bei Noradrenalin-Behandlung zu einer Angleichung der Plasmaleptinspiegel von *fa/fa* und *+/fa* Tieren auf einem niedrigen Niveau kommt, ohne daß hierfür eine Reduzierung des Gesamtkörperfettgehaltes erforderlich ist.*

#### **3.3.2.5. Einfluß der SAA und der Nettoenergiezufuhr auf die Leptin-mRNA-Konzentration im WAT**

Eine Reduzierung der SAA durch thermoneutrale Haltung für 2 oder 6 Tage eliminiert die Gendosis-abhängigen Unterschiede in der Leptin-mRNA-Konzentration im WAT (Abbildung 14 C, Mitte) auf einem Niveau, das etwa in der Mitte der Werte der unter Kältebelastung aufgezogenen *+/fa* und *fa/fa* Tiere liegt. Trotz des deutlich höheren Körperfettgehaltes sind die Werte nach 6 Tagen unter thermoneutralen Bedingungen dabei nur geringfügig höher als die nach 2 Tagen.

Wenn eine Erhöhung der Aktivität des SNS durch Noradrenalin-Behandlung imitiert wurde, führte dies - relativ zu den thermoneutral aufgezogenen Tieren - nur zu einer Erniedrigung der Leptin-mRNA-Konzentration im WAT von *+/fa* und *fa/fa* Tieren, wenn gleichzeitig die Nettoenergiezufuhr reduziert wurde und damit der Gesamtkörperfettgehalt sank (Wurf #16). Sorgte man dafür, daß der Gesamtkörperfettgehalt der mit Noradrenalin behandelten Tiere hoch blieb (Würfe #14 und 15), war die erhöhte SAA nicht in der Lage die Leptin-mRNA-Konzentration im WAT von *fa/fa* und *+/fa* Tieren zu erniedrigen. In diesem Fall blieb die Leptin-mRNA-Konzentration der *+/fa* Tiere ebenso hoch wie bei den unbehandelten, thermoneutral gehaltenen Tieren. Die Leptin-mRNA-Konzentration der *fa/fa* Tiere war sogar tendenziell höher als bei den unbehandelten, thermoneutral aufgezogenen Tieren ( $p = 0,06$  für den Genotypunterschied), was jedoch, wie die Betrachtung der Einzelwerte zeigte, überwiegend darauf beruhte, daß nur 2 der 10 *fa/fa* Tiere erheblich höhere Werte aufwiesen als ihre Wurfgeschwister, ohne daß abweichende Werte im Körperfettgehalt vorlagen.

### *Schlußfolgerung*

*Bei der Beurteilung der Wirkung der SAA auf die Lep-Expression im WAT kann man davon ausgehen, daß hier - im Gegensatz zum BAT - eine Stimulierung der Fettsäureoxidation zur Steigerung der Wärmeproduktion keine Rolle spielt. Aufgrund früherer Untersuchungen (Moinat et al. 1995, Trayhurn et al. 1996, Evans et al. 1999) hätte man aber erwartet, daß eine Erniedrigung der SAA trotzdem zu einem Anstieg der Leptin-mRNA-Konzentration der +/+ Tiere und nicht zu einer Senkung bei den fa/fa Tieren führen würde. Das umgekehrte Ergebnis zeigt, daß die SAA an sich kein wichtiger bestimmender Faktor der Lep-Expression im WAT ist. Da eine Erhöhung der SAA nur dann zu einer deutlichen Erniedrigung der Leptin-mRNA-Konzentration im WAT von +/fa und fa/fa Tieren relativ zu kältebelasteten Tieren führt, wenn gleichzeitig der Gesamtkörperfettgehalt und die akute Nettoenergiezufuhr sinken, ist anzunehmen, daß der Lipidgehalt und/oder die Energieströme in den Adipozyten eine wichtige Rolle in der Regulation der Lep-Expression im WAT spielen. Da andererseits bei den ohne Noradrenalin-Behandlung thermoneutral gehaltenen Tieren der Einfluß des Körperfettgehaltes auf die Lep-Expression im WAT nur gering war, scheinen eher die Energieströme in den Adipozyten als der zelluläre Lipidgehalt ausschlaggebend zu sein.*

### **3.3.2.6. Einfluß der SAA und der Nettoenergiezufuhr auf die Leptin-mRNA-Konzentration im BAT**

Minimierung der SAA durch thermoneutrale Aufzucht für zwei oder sechs Tage (Würfe #10-13) führt in Abhängigkeit von der Dauer zu einem drastischen Anstieg der Leptin-mRNA-Werte im BAT von +/fa und fa/fa Tieren, relativ zu den normal oder künstlich unter moderater Kältebelastung aufgezogenen Tieren. Dabei kommt es zu einer völligen Elimination der Unterschiede in der Leptin-mRNA-Konzentration im BAT der +/fa und fa/fa-Tiere.

Die starke Wirkung der SAA auf die Leptin-mRNA-Konzentration im BAT zeigt sich auch unter Noradrenalin-Behandlung. Es kommt zu einem dramatischen Abfall und einer Angleichung der Leptin-mRNA-Konzentration im BAT von fa/fa und +/fa Welpen auf einem sehr niedrigen Niveau, unabhängig davon, ob die Nettoenergiezufuhr und der Gesamtkörperfettgehalt hoch oder niedrig sind.

### *Schlußfolgerung*

*Bei der Beurteilung des Noradrenalin-Effektes auf die Lep-Expression im BAT ist zu beachten, daß – im Unterschied zum WAT - von einer starken Aktivierung des Fettsäureverbrauchs zur Steigerung der Wärmeproduktion auszugehen ist. Die Lep-Expression im BAT zeigt - ebenfalls im Gegensatz zu den Effekten im WAT - die erwartete starke Abhängigkeit von der SAA.*

### **3.3.3. Regressionsanalysen zur Ermittlung des Zusammenhangs zwischen SAA, Körperfettgehalt, Plasmaleptinspiegel und Leptin-mRNA-Konzentration**

Da die starken Wurfunterschiede nur eine statistische Auswertung der Daten innerhalb der gleichen Versuchsgruppe, nicht jedoch über die verschiedenen Versuchsgruppen hinweg erlaubten, wurden zur statistischen Analyse der Zusammenhänge zwischen den untersuchten Variablen Regressionsanalysen herangezogen. Wie in Voruntersuchungen ausführlich dargelegt (Kraeft et al. 1999), stellen die Regressionsanalysen eine geeignete Alternative dar, um bei Versuchen, bei denen die statistische Berücksichtigung des Wurffaktors nicht möglich ist, den durch unterschiedliche Aufzucht und/oder genetischen Hintergrund verursachten Unterschieden im Wachstum von Tieren aus verschiedenen Würfen Rechnung zu tragen. Dieser Ansatz wurde auch bereits in der unmittelbaren Vorläuferstudie dieser Arbeit erfolgreich für die Analyse der Zusammenhänge zwischen Plasmaleptinspiegel und Körperfettgehalt angewandt (Zhang et al. 1997, Olbort 1998). In der vorliegenden Arbeit wurde ausgehend von entsprechenden Untersuchungen linearer Regressionen schließlich eine zusammenfassende statistische Betrachtung der Zusammenhänge zwischen allen untersuchten Variablen durch eine multifaktorielle Regressionsanalyse ermöglicht.

#### **3.3.3.1. Einfluß der SAA auf den Zusammenhang zwischen Plasmaleptinkonzentration bzw. Leptin-mRNA-Konzentration im BAT und WAT und dem Gesamtkörperfettgehalt**

Abbildung 15 A zeigt getrennt für die *+/fa* und *fa/fa* Tiere die Abhängigkeit der Plasmaleptinkonzentration vom prozentualen Gesamtkörperfettgehalt sowohl für die verschiedenen Versuchsbedingungen bei den künstlich aufgezogenen Tieren wie für die normal aufgezogenen Tiere. Erwartungsgemäß liegen die Werte der mit Noradrenalin

behandelten Tiere am niedrigsten, wobei sich bei den *fa/fa* Tieren eine sehr enge Korrelation ( $r = 0,81$ ) ergibt. Die korrespondierende Regressionsgerade für die *+fa* Tiere ( $r = 0,51$ ) verläuft deutlich ( $p < 0,05$ ) flacher. Unter thermoneutralen Bedingungen unterscheiden sich die Geraden von *+fa* und *fa/fa* Tieren nicht signifikant. Bei den *fa/fa* Tieren ist die Regressionsgerade für die 2 und 6 Tage lang thermoneutral gehaltenen Tiere parallel nach oben verschoben, bei den *+fa* Tieren verläuft die Gerade signifikant steiler als bei den mit Noradrenalin behandelten Tieren gleichen Genotyps. Erstaunlicherweise liegen jedoch die gemeinsamen Regressionsgeraden für die normal und künstlich unter moderater Kältebelastung aufgezogenen Tiere sowohl für die *+fa* wie für die *fa/fa* Tiere nicht zwischen den beiden anderen Regressionsgeraden, sondern sind gegenüber den thermoneutral gehaltenen Tieren parallel nach oben verschoben ( $p < 0,001$  für Vergleich paralleler Geraden). Bei den *+fa* Tieren streuen die Daten der kältebelasteten Tiere stark um die Gerade. Dabei zeigt sich, daß die Daten der künstlich aufgezogenen Tiere (dunkle Symbole mit Punkt bzw. Kreuz), wie eigentlich zu erwarten wäre, im Bereich der Geraden für thermoneutral und mit Noradrenalin-Behandlung aufgezogenen Tiere liegen. Die Daten der normal aufgezogenen Tiere liegen dagegen höher. Hier deutet sich also ein durch die künstliche Aufzucht als solcher verursachter Effekt an. Bei den *fa/fa* Tieren dagegen liegen die Werte der künstlich aufgezogenen Tiere, einschließlich des Wurfs #8, auf der gleichen Regressionsgeraden wie die der normal aufgezogenen kältebelasteten Tiere. Die Verschiebung der gemeinsamen Regressionsgeraden für die normal und künstlich kältebelasteten Tiere gegenüber den thermoneutral aufgezogenen Tieren nach oben scheint also bei *+fa* und *fa/fa* Tieren auf unterschiedlichen Faktoren zu beruhen.

Interessanterweise zeigen die engen Korrelationen ( $0,63 \leq r \leq 0,82$ ) zwischen dem Körperfettgehalt und der Leptin-mRNA-Konzentration im BAT (Abbildung 15 B) die erwartete Lage der Werte der unter Kältebelastung aufgezogenen Tiere zwischen den Regressionsgeraden für die thermoneutral aufgezogenen bzw. mit Noradrenalin behandelten Tiere. Für die Leptin-mRNA-Konzentration im WAT (nicht gezeigt) ergeben sich dagegen überwiegend nur sehr lockere Korrelationen, die keine systematische Beziehung zur Veränderung der SAA zeigen.

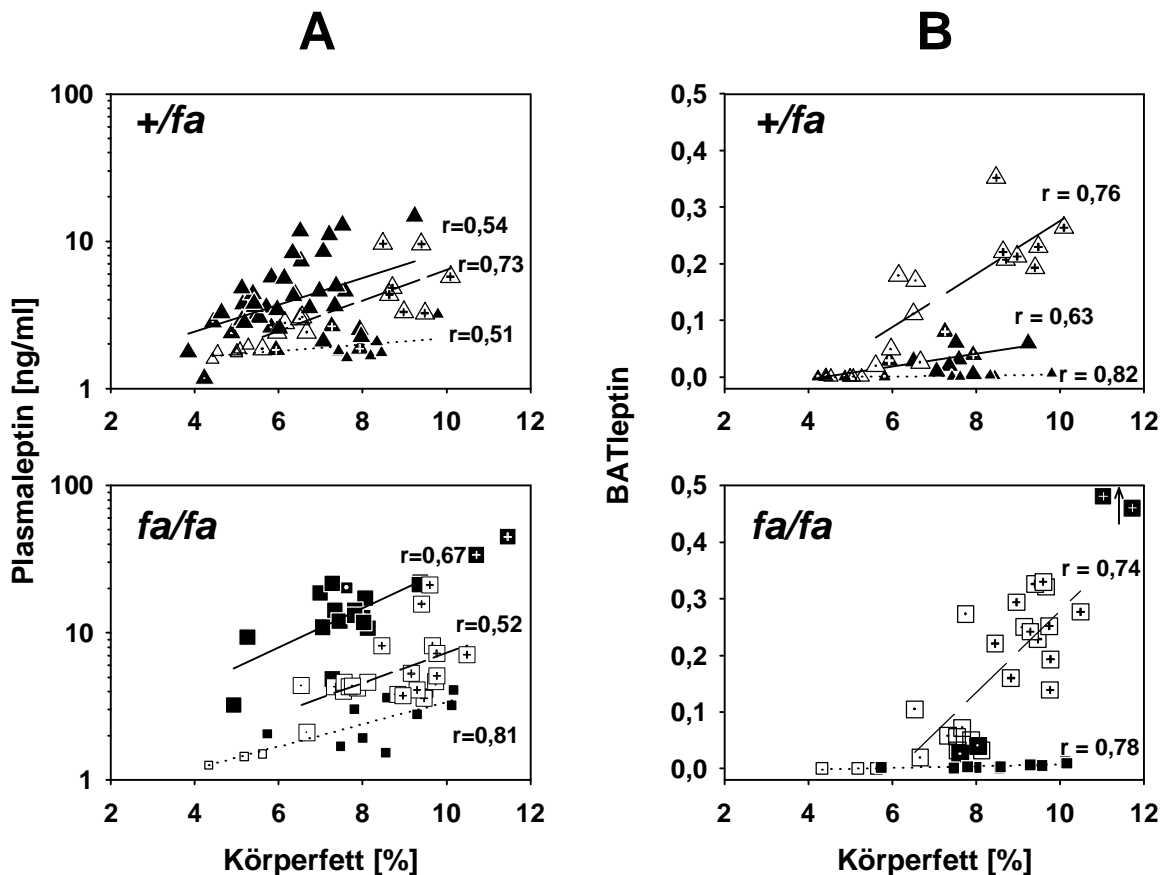


Abbildung 15: Korrelationen zwischen Plasmaleptinspiegel (A) bzw. Leptin-mRNA-Konzentration im BAT (B, logarithmische Auftragung) und dem prozentualen Körperfettgehalt bei 10 Tage alten künstlich und normal aufgezogenen Tieren getrennt für die Genotypen *+/fa* ( $\Delta$ , oben) und *fa/fa* ( $\square$ , unten). Gemeinsame Regressionsgerade (—) für die unter Kältebelastung künstlich ( $\blacktriangle$ ,  $\blacksquare$ ) und normal aufgezogenen Tiere ( $\triangle$ ,  $\square$ ). Gemeinsame Regressionsgerade (---) für die 2 Tage lang ( $\triangle$ ,  $\square$ ) und 6 Tage lang ( $\triangle$ ,  $\boxplus$ ) thermoneutral gehaltenen Tiere. Regressionsgerade (.....) für die 6 Tage lang unter thermoneutralen Bedingungen mit Noradrenalin behandelten Würfe mit hoher ( $\blacktriangle$ ,  $\blacksquare$ ) bzw. niedriger Körperfettmasse ( $\triangle$ ,  $\square$ ). Die Korrelationskoeffizienten ( $r$ ) sind angegeben. Da nur bei wenigen der normal aufgezogenen Tiere die Leptin-mRNA-Konzentration und die Körperzusammensetzung gemeinsam bestimmt werden konnte, ist die Anzahl der dargestellten normal aufgezogenen *+/fa* Tiere beschränkt, *fa/fa* Tiere kommen gar nicht vor.

### 3.3.3.2. Abhängigkeit der Leptin-mRNA-Konzentration im BAT und WAT sowie des Plasmaleptinspiegels von der MS-MR

Um die Auswirkungen der veränderten SAA auf die Leptin-mRNA-Konzentration und die resultierenden Veränderungen im Plasmaleptinspiegel zu untersuchen, wurden diese mit der MS-MR während der letzten 24 h des Experimentes, als Indikator für die SAA, korreliert. Mit einem  $r$  von -0,92 ergab sich eine beeindruckend enge inverse Korrelation

zwischen der MS-MR und der Leptin-mRNA-Konzentration im BAT (Abbildung 16 C), ohne daß sich Genotypunterschiede andeuteten. Angesichts der großen Zahl von Werten von thermoneutral aufgezogenen Tieren, die sich im oberen Bereich der Grade häufen, ist zu beachten, daß auch die Werte der 2 kältebelasteten *fa/fa* Tiere mit entsprechend niedrigeren Werten genau auf die Regression fallen und daß die Werte des nicht in die Regressionsberechnung einbezogenen kältebelasteten Wurfes #8, nur leicht nach oben verschoben, den gleichen Zusammenhang widerspiegeln. Die überaus enge negative Korrelation zwischen MS-MR und der Leptin-mRNA-Konzentration im BAT ist also kein statistisches Artefakt.

Im scharfen Kontrast zum BAT ist die Leptin-mRNA-Konzentration der gleichen Tiere im WAT dagegen überhaupt nicht ( $r = -0,08$ ) mit der MS-MR korreliert (Abbildung 16 B). Die Plasmaleptinspiegel derselben Individuen weisen dagegen wiederum eine signifikante negative Korrelation mit der MS-MR ( $r = -0,62$ ) auf (Abbildung 16 A). Hierbei fällt auf, daß die Werte der Tiere mit einem Plasmaleptinspiegel  $>10$  ng/ml auffallend nach oben verschoben sind, wobei in diesen Bereich auch die Werte der *fa/fa* Tiere des Wurfs #8 fallen. Aufgrund dieser Beobachtung schien es sinnvoll, in den weiteren Korrelationsanalysen zunächst nur die Werte von Tieren  $<10$  ng/ml einzubeziehen. Aufgrund der geringen Zahl der ausgeschlossenen Werte veränderte die erneute Berechnung der in Abbildung 16 A gezeigten Korrelationen nach Ausschluß dieser Werte die Lage der Korrelationen kaum. Als Beispiel ist die korrigierte Korrelation als graue Linie in Abbildung 16 A für den Zusammenhang zwischen Plasmaleptinspiegel und MS-MR gezeigt. Die Korrelationskoeffizienten verändern sich generell nach Ausschluß der Werte von Tieren mit einem Plasmaleptinspiegel  $>10$  ng/ml ebenfalls nur unwesentlich ( $r = -0,68$  (A),  $r = -0,05$  (B),  $r = -0,92$  (C)).

### **3.3.3.3. Einfluß der Leptin-mRNA-Konzentration im WAT und BAT auf den Plasmaleptinspiegel**

Um die Beziehung zwischen der Leptin-mRNA-Konzentration im BAT und WAT und dem Plasmaleptinspiegel zu untersuchen, wurde die Leptin-mRNA-Konzentration der künstlich aufgezogenen Tiere unter den verschiedenen experimentellen Bedingungen mit

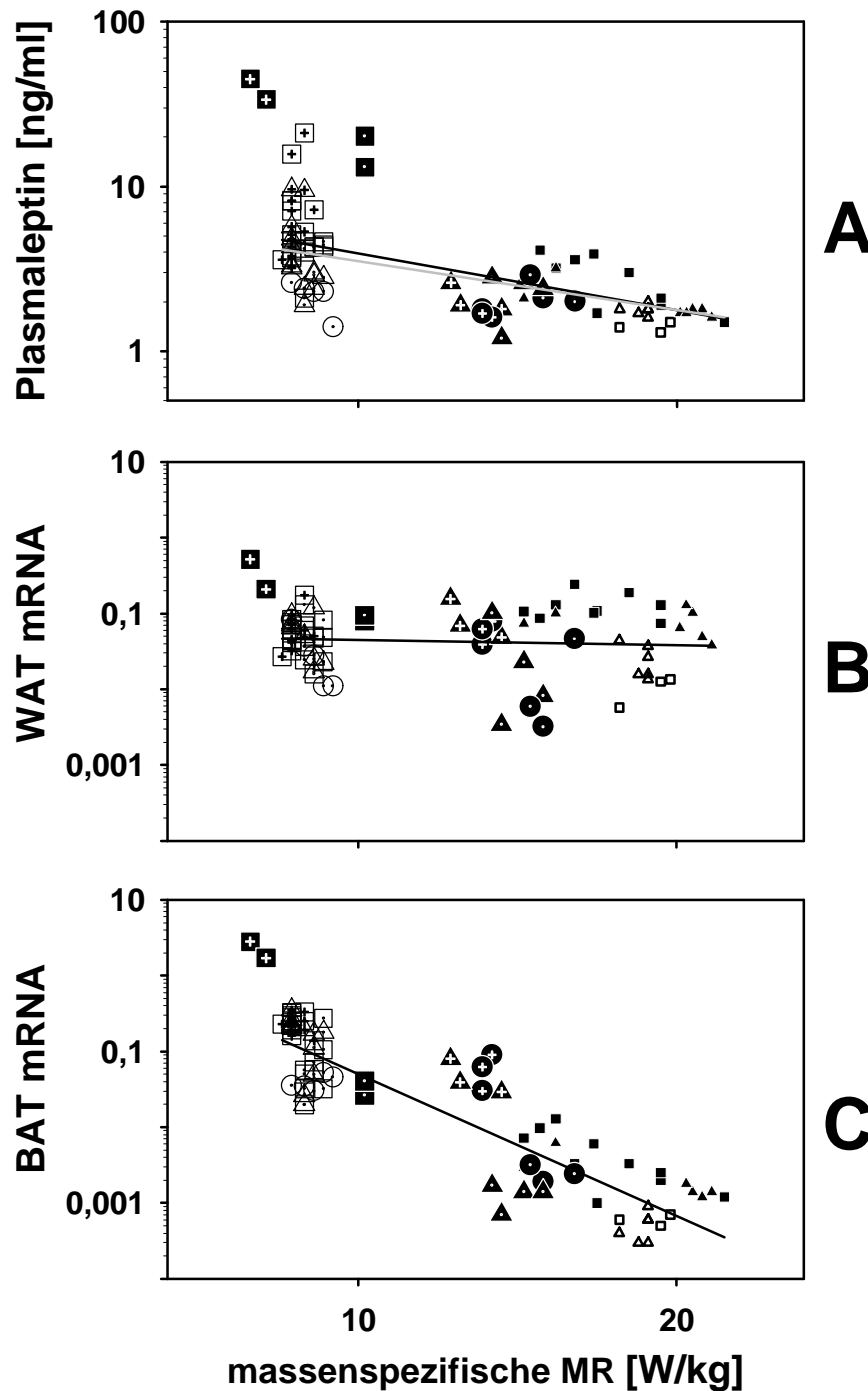


Abbildung 16: Korrelationen zwischen dem Plasmaleptinspiegel (A), der Leptin-mRNA-Konzentration [Leptin/Aktin] im WAT (B) und im BAT (C) mit der massenspezifischen metabolischen Rate von 10 Tage alten, künstlich aufgezogenen Tieren in halblogarithmischer Darstellung. Versuchsbedingungen: 2 d thermoneutral (○, △, □), 6 d thermoneutral (△, ⊕), 2 d Kältebelastung (●, ▲, ■ Wurf #9 und ⊕, ▲, ⊕ Wurf #8, der in die statistischen Auswertungen nicht einbezogen wurde), 6 d thermoneutral incl. Noradrenalin-Behandlung mit hoher (▲, ■), sowie niedriger Körperfettmasse (△, □). Genotypen +/+ (○), +/fa (△) und fa/fa (□). Für den Plasmaleptinspiegel ist eine zweite Regressionsgerade unter Ausschluß der Werte >10 ng/ml dargestellt (grau). Die Korrelationskoeffizienten sind im Text angegeben.



dem Plasmaleptinspiegel korreliert (Abbildung 17). Die Daten für die Leptin-mRNA- und die Plasmaleptinkonzentration wurden in logarithmischer Skalierung dargestellt, um den Einschluß der von der Normalverteilung abweichenden niedrigen Werte der mit Noradrenalin behandelten Tiere zu ermöglichen. Aufgrund technischer Probleme in der Anfangsphase der Versuche konnte die Leptin-mRNA-Konzentration im WAT und BAT sowie der Plasmaleptinspiegel nur für wenige normal aufgezogene Tiere gleichzeitig bestimmt werden. Um trotzdem einen direkten Vergleich zwischen normal und künstlich aufgezogenen Tieren zu ermöglichen, wurden die gewichteten Mittelwerte, die durch die Bestimmung der Leptin-mRNA-Konzentration sowie der Plasmaleptinspiegel in verschiedenen Gruppen normal aufzogener Tiere ermittelt wurden, als überdimensionale Zeichen ebenfalls in Abbildung 17 dargestellt.

Eine einfache lineare Regressionsanalyse für die Daten der künstlich aufgezogenen Tiere mit einem Plasmaleptinspiegel von unter 10 ng/ml ergibt eine gemeinsame Regressionsgerade für  $+/+$ ,  $+/fa$  und  $fa/fa$  Tiere, wobei die Korrelation für die BAT-Werte deutlich höher ist als für die WAT-Werte. Damit bestätigen die Befunde bei den künstlich aufgezogenen Tieren die deutlich engere Beziehung zwischen dem Plasmaleptinspiegel und der Leptin-mRNA-Konzentration im BAT im Vergleich zum WAT. Obwohl der gewählte Cut-off von 10 ng/ml willkürlich gewählt wurde, ist offensichtlich, daß die Relation zwischen Plasmaleptin- und Leptin-mRNA-Konzentration im WAT und BAT für die Tiere mit Plasmaleptinspiegeln über 10 ng/ml zu höheren Werten verschoben ist. Solche Werte wurden vor allem bei  $fa/fa$  Tieren beobachtet, die bei normaler oder künstlicher Aufzucht einer moderaten Kältebelastung ausgesetzt waren (vgl. Abbildung 15 B). Im Gegensatz hierzu lagen unter allen anderen Versuchsbedingungen, in denen die SAA der  $+/fa$  und  $fa/fa$  Tiere entweder durch Thermoneutralaufzucht oder durch Noradrenalin-Behandlung nivelliert wurde, die Plasmaleptinspiegel der  $fa/fa$  Tiere in der Regel im gleichen Bereich wie die der  $+/fa$  und  $+/+$  Tiere. Nur bei 2 von 34 unter thermoneutralen Bedingungen aufgezogenen  $fa/fa$  Tieren traten aus nicht zu erklärenden Gründen ebenfalls Plasmaleptinwerte von über 10 ng/ml auf. Die Mittelwerte der normal aufgezogenen  $+/+$  Tiere liegen genau im mittleren Bereich der Werte, die bei den künstlich aufgezogenen Tieren erhoben wurden, die Werte der  $+/fa$  Tiere sind etwas nach oben verschoben.

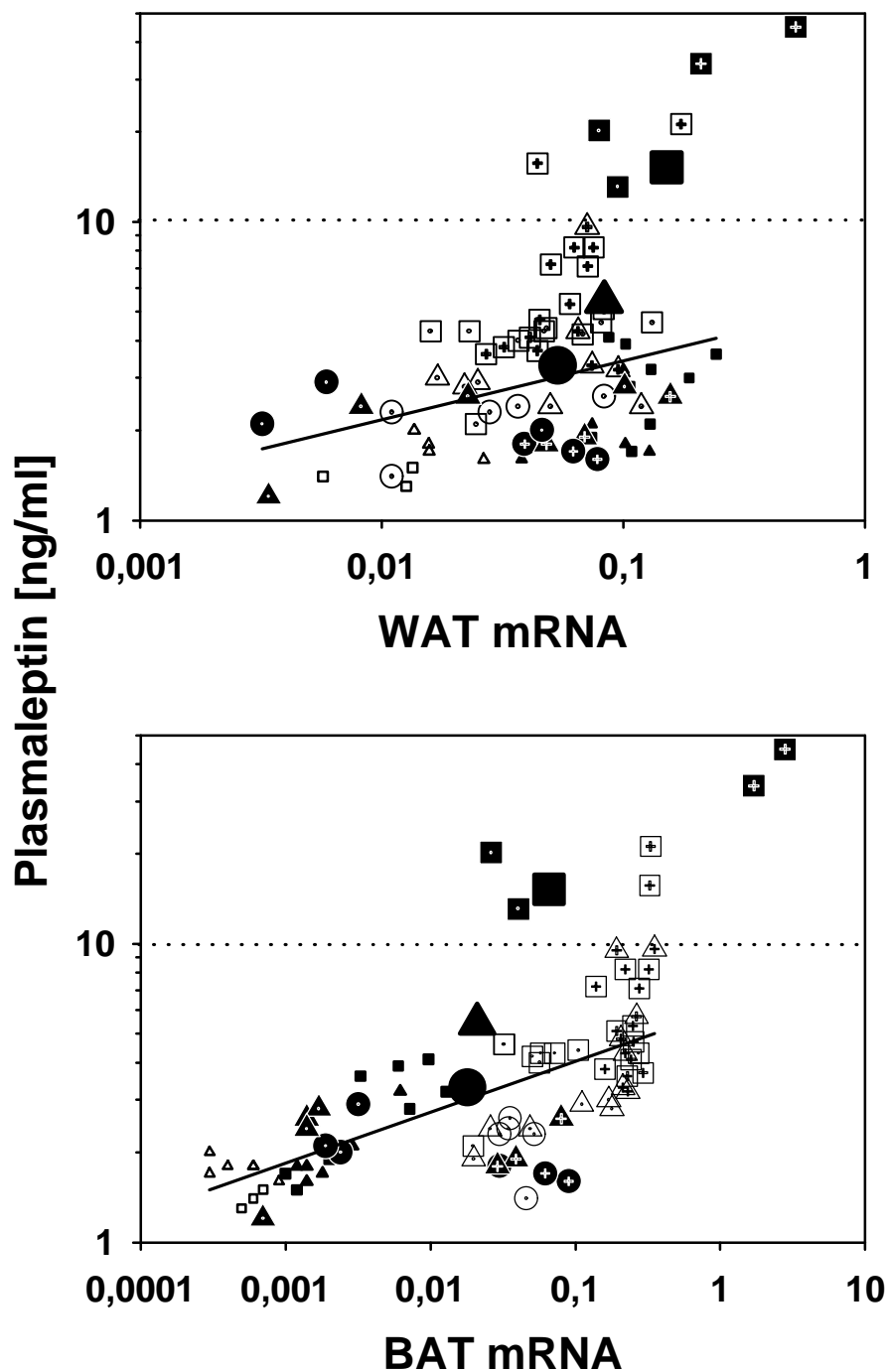


Abbildung 17: Korrelationen zwischen dem Plasmaleptinspiegel und der Leptin-mRNA-Konzentration [Leptin/Aktin] im WAT (oben,  $r = 0,39$ ) sowie im BAT (unten,  $r = 0,78$ ) von 10 Tage alten künstlich aufgezogenen Tieren in doppellogarithmischer Darstellung. Bei der künstlichen Aufzucht wurde zwischen folgenden Versuchsbedingungen unterschieden: 2 d thermoneutral ( $\odot, \triangle, \square$ ), 6 d thermoneutral ( $\triangle, \boxplus$ ), 2 d Kältebelastung ( $\bullet, \blacktriangle, \blacksquare$  Wurf #9 und  $\oplus, \blacktriangle, \boxplus$  Wurf #8, der in die statistischen Auswertungen nicht einbezogen wurde), 6 d thermoneutral incl. Noradrenalin-Behandlung mit hoher ( $\blacktriangle, \blacksquare$ ) bzw. niedriger Körperfettmasse ( $\triangle, \square$ ). Genotypen  $+/+$  ( $\circ$ ),  $+/fa$  ( $\triangle$ ) und  $fa/fa$  ( $\square$ ). Es wurde jeweils eine Regressionsgerade für die künstlich aufgezogenen Tiere mit einem Plasmaleptinspiegel unter 10 ng/ml dargestellt. Überdimensionale Zeichen zeigen zum Vergleich die gewichteten Mittelwerte der normal aufgezogenen Tiere.

### **3.3.3.4. Untersuchung der gegenseitigen Abhängigkeit von Plasmaleptinspiegel und Leptin-mRNA-Konzentration im WAT und BAT sowie deren Abhängigkeit von weiteren physiologischen Determinanten durch multiple Regressionsanalysen**

Multiple Lineare Regressionsanalysen wurden verwendet, um die Interaktionen der verschiedenen physiologischen Faktoren zu untersuchen, die an der Regulation des Plasmaleptinspiegels und der *Lep*-Expression im BAT und WAT beteiligt sind. Da viele der untersuchten Parameter, wie z.B. der Fettgehalt, durch das Wachstum beeinflusst werden, wurde die FFDM als zusätzliche Variable verwendet, um Unterschiede in der Größe der Tiere zu berücksichtigen. Als weitere Parameter wurden die absolute Fettmasse, die  $\Sigma$ MR während der letzten 24 h (als Indikator für die SAA), die Nettoenergiezufuhr während der letzten 24 h sowie der Genotyp verwendet. Es wurden hierbei die Daten aller künstlich aufgezogenen Tiere mit einem Plasmaleptinspiegel unter 10 ng/ml (N=70) ausgewertet, wobei auch hier Wurf #8 nicht in die statistische Auswertung einbezogen wurde. Die Ergebnisse sind in Tabelle IV zusammengefaßt.

#### **3.3.3.4.1. Abhängigkeit des Plasmaleptinspiegels von der Leptin-mRNA-Konzentration im WAT und BAT**

Untersucht man die Abhängigkeit des Plasmaleptinspiegels von der Leptin-mRNA-Konzentration im BAT und WAT sowie vom Genotyp, zeigt sich bei einem  $R^2$  von 0,70 wiederum, daß die Leptin-mRNA-Konzentration im BAT einen ausschlaggebenden Einfluß auf den Plasmaleptinspiegel hat und 60% der Variabilität erklärt, während die Leptin-mRNA-Konzentration im WAT nur 3% der Variabilität erklärt. Der Genotyp zeigt ebenfalls einen schwachen, aber signifikanten Einfluß, der 7% der Variabilität erklären kann. Eine Wiederholung der Analyse unter Einschluß der Tiere mit einem Plasmaleptinspiegel über 10 ng/ml resultierte in einem niedrigeren  $R^2$  (0,61), erbrachte aber prinzipiell gleiche Ergebnisse. Die Einbeziehung der MR als Surrogatvariable für die SAA als zusätzliche unabhängige Variable in diese Regressionsanalyse erhöhte  $R^2$  nicht (Daten nicht gezeigt).

Aufgrund des signifikanten Genotyp-Effektes wurden die Daten der *+/-fa* und *fa/fa* Tiere zusätzlich getrennt ausgewertet. Diese Analyse bestätigte den dominierenden Effekt der Leptin-mRNA-Konzentration im BAT im Vergleich zum WAT auf den

Plasmaleptinspiegel von *fa/fa* und *+fa* Tieren, wobei der Einfluß der Leptin-mRNA-Konzentration im WAT auf die *+fa* Tiere das statistische Signifikanzniveau knapp verfehlte ( $p=0,07$ ).

		ß der unabhängigen Variablen							
	abhängige Variable	R <sup>2</sup>	log BAT mRNA	log WAT mRNA	SAA	Fett	NEZ	FFDM	Genotyp
Alle	log Plasmaleptin	0,70	0,69 ***	0,17 *					0,22 **
	log Plasmaleptin	0,70			-0,58 ***	0,50 ***	-0,30 **	-0,20 *	0,12
	log BAT-mRNA	0,93			-0,78 ***	0,37 ***	-0,13 **	-0,03	-0,06
	log WAT-mRNA	0,53			0,36 **	0,39 **	0,55 ***	-0,16	-0,03
	Fett [g]	0,55			-0,38 ***		0,37 **	0,08	0,18
<i>+fa</i>	log Plasmaleptin	0,61	0,73 ***	0,13					
	log Plasmaleptin	0,73			-0,78 ***	0,51 **	-0,46 *	-0,29 *	
	log BAT-mRNA	0,94			-0,75 ***	0,37 ***	-0,09	0,03	
	log WAT-mRNA	0,48			0,17	0,42	0,35	-0,19	
	Fett [g]	0,55			-0,24		0,57 **	0,01	
<i>fa/fa</i>	log Plasmaleptin	0,81	0,84 ***	0,31 ***					
	log Plasmaleptin	0,76			-0,52 ***	0,44 **	0,09	-0,10	
	log BAT-mRNA	0,93			-0,77 ***	0,33 ***	-0,08	-0,07	
	log WAT-mRNA	0,59			0,35 *	0,33	0,61 ***	-0,12	
	Fett [g]	0,52			-0,51 ***		0,33 *	0,19	

Tabelle IV: Zusammenstellung der Ergebnisse der Multiplen Linearen Regressionsanalysen. Dargestellt sind die standardisierten Korrelationskoeffizienten ( $\beta$ ) und deren Signifikanzniveau (\*\*\* =  $p<0,001$ , \*\* =  $p<0,01$ , \* =  $p<0,05$ ), sowie das Quadrat des multiplen Korrelationskoeffizienten ( $R^2$ ) aus der Multiplen Linearen Regressionsanalyse der Daten der künstlich aufgezogenen Tiere mit einem Plasmaleptinspiegel  $<10$  ng/ml ( $N=70$ ). Untersucht wurde die Abhängigkeit einer Variablen von verschiedenen unabhängigen Variablen. Als Variablen dienten die Metabolische Rate als Surrogatvariable für die sympatho-adrenerge Aktivität (SAA) und die Nettoenergiezufuhr (NEZ) während der letzten 24 h, der Körperfettgehalt (Fett), die fettfreie Trockenmasse als Maß für die Größe der Tiere (FFDM) und der Genotyp, sowie in logarithmierter Form (log), um die Datenverteilung zu normalisieren, die Leptin-mRNA-Konzentration im braunen (BAT) und im weißen (WAT) Fettgewebe und der Plasmaleptinspiegel.

### 3.3.3.4.2. Abhängigkeit des Plasmaleptinspiegels von weiteren physiologischen Faktoren

Um Klarheit über den Einfluß anderer physiologischer Variablen auf den Plasmaleptinspiegel zu erhalten, wurde unter Ausschluß der Leptin-mRNA-Konzentrationen als vermittelnder Variablen, die Wirkung von SAA, Körperfettmasse, Nettoenergiezufuhr, FFDM und Genotyp auf den zirkulierenden Leptinspiegel untersucht.

Das Ergebnis dieser multiplen linearen Regressionsanalyse ist ebenfalls in Tabelle IV gezeigt. Es zeigte sich der erwartete, negative Einfluß der SAA, der 11% der Variabilität des Plasmaleptinspiegels erklärt. Der positive Einfluß des Körperfettgehaltes ist deutlich stärker und erklärt 52% der Variabilität. Die Nettoenergiezufuhr und die FFDM haben auch einen signifikanten, aber schwachen, negativen Einfluß auf den Plasmaleptinspiegel, sie erklären nur 3 und 2% der Variabilität. In dieser Analyse wurde keine zusätzliche Auswirkung des Genotyps auf den Plasmaleptinspiegel gefunden.

#### **3.3.3.4.3. Abhängigkeit der Leptin-mRNA-Konzentration im WAT und BAT von verschiedenen physiologischen Variablen**

Weiterhin wurde analysiert, welche der untersuchten Variablen die Leptin-mRNA-Konzentration im BAT und WAT bestimmt. Die Analyse für das BAT zeigte bei einem beeindruckend hohen  $R^2$  von 0,93 einen dominierenden inversen Zusammenhang mit der SAA, der 87% der Variabilität erklären konnte. Zudem ergab sich eine positive Korrelation mit der Körperfettmasse, die ohne einen signifikanten Genotypeinfluß 5% der Variabilität erklären konnte. Überraschender Weise ergab sich ein schwach negativer Einfluß der Nettoenergiezufuhr (1%), der vermutlich ein statistisches Artefakt darstellt und bei getrennter Analyse der Daten von  $+/fa$  und  $fa/fa$  Tieren verschwindet, während die Fettmasse auch bei getrennter Analyse 5-6% der Variabilität erklären kann.

Im Gegensatz dazu ist die Leptin-mRNA-Konzentration im WAT nur schwach durch die SAA (5%) und die Fettmasse (6%) bestimmt, bei einem insgesamt sehr viel niedrigerem  $R^2$  von 0,53. Der wichtigste bestimmende Faktor ist hier die Nettoenergiezufuhr, sie erklärt 40% der Variabilität. Überraschender Weise ist der Einfluß der SAA positiv statt negativ, wie man aufgrund der Effekte auf die *Lep*-Expression im BAT und früherer Studien (Moinat et al. 1995, Trayhurn et al. 1996, Evans et al. 1999) erwartet hätte. Dem insgesamt schwachen Einfluß der SAA entspricht aber das Ergebnis der einfachen Korrelationsanalyse für dieselben Tiere in Abbildung 17 (unten), in der sich kein Einfluß der SAA nachweisen ließ.

Die getrennte Analyse der Daten von  $+/fa$  und  $fa/fa$  Tieren zeigte dann auch, daß die SAA keinen Einfluß auf die Leptin-mRNA-Konzentration im WAT von  $+/fa$  Tieren ( $p=0,93$ ) hat und eine schrittweise Analyse ergab, daß ihre Leptin-mRNA-Konzentration

überwiegend positiv durch die Körperfettmasse (36%) beeinflusst wird, wobei aber bei einem  $R^2$  von nur 0,48 der Einfluß keiner der untersuchten Variablen das Signifikanzniveau erreichte. Die entsprechende Analyse für die *fa/fa* Tiere ergibt mit einem  $R^2$  von 0,59 eine deutlich engere Korrelation der Leptin-mRNA-Konzentration im WAT mit den untersuchten Variablen, wobei der bestimmende Faktor die Nettoenergiezufuhr ist, die 51% der Variabilität erklärt. Zusätzlich ergibt sich eine schwache positive Korrelation der Leptin-mRNA-Konzentration im WAT mit der SAA, die aber nur 4% der Variabilität erklären kann und mit  $p = 0,048$  nur knapp das Signifikanzniveau erreicht. Insgesamt erweist sich die überraschenderweise positive Korrelation der SAA mit der Leptin-mRNA-Konzentration im WAT bei gemeinsamer Betrachtung aller Tiere allenfalls als ein marginaler Effekt.

#### **3.3.3.4.4. Einflußvariablen für die Körperfettmasse**

Die Körperfettmasse wird wie erwartet vor allem positiv durch die Nettoenergiezufuhr beeinflusst, die 41% der Variation erklärt. Daneben ergibt sich ein negativer Einfluß der SAA, der für 11% der Variation verantwortlich ist. Obwohl der Einfluß des Genotyps bei der Analyse der Gesamtdaten nicht signifikant ist, bestätigt eine getrennte Analyse für die *+fa* Tiere einen starken Einfluß der Nettoenergiezufuhr, während bei den *fa/fa* Tieren für die hier analysierten Daten (Plasmaleptinspiegel  $<10$  ng/ml) der inverse Einfluß der SAA dominiert (40% der Variabilität) und die Nettoenergiezufuhr einen schwächeren Einfluß hat (8%). Auch bei Einschluß der Werte  $>10$  ng/ml ergaben sich sehr ähnliche Zusammenhänge.

#### *Schlußfolgerung*

*Multifaktorielle Regressionsanalysen zeigen, daß die Gendosis nur einen signifikanten Einfluß auf den Plasmaleptinspiegel hat, wenn als intervenierende Variablen die Leptin-mRNA-Konzentrationen im BAT und WAT betrachtet werden. Bei Verwendung von Körperfettmasse, Nettoenergiezufuhr und SAA als unabhängige Variablen tritt dagegen kein signifikanter Gendosis-Effekt mehr zu Tage. Ein Gendosis-Effekt, der sich über den vermuteten autokrinen Einfluß von Leptin auf seine eigene Expression auswirkt, ließ sich somit gegen die Einflüsse der untersuchten Parameter der Energiebilanz nicht abgrenzen.*

## 4. Diskussion

### 4.1. Gendosis-Effekte auf den perinatalen Plasmaleptinspiegel

Ein wesentlicher neuer Befund dieser Arbeit war der Nachweis eines deutlichen Unterschiedes im Plasmaleptinspiegel zwischen  $+/+$ ,  $+/fa$  und  $fa/fa$  Wurfgeschwistern unmittelbar nach der Geburt. Zudem bestätigten die vorliegenden Ergebnisse, wie zuvor bei Wildtyp-Tieren nachgewiesen wurde (Dessolin et al. 1997, Herrera et al. 2000), daß bereits perinatal ein meßbarer Plasmaleptinspiegel bei Rattenwelpen feststellbar ist, obwohl bei Ratten in diesem Alter die Triglyzeridspeicherung erst postnatal nach dem ersten Säugen einsetzt. Das vorgelegte Ergebnis stützt somit überzeugend Studien an 10 Tage alten Ratten, die zeigten, daß der Gendosis-Effekt auf den Plasmaleptinspiegel nicht vollständig durch den Gendosis-Effekt auf den Körperfettgehalt erklärbar ist (Zhang et al. 1997, Olbort 1998).

Der direkt nach der Geburt nachgewiesene Effekt der Gendosis auf den Plasmaleptinspiegel ist die früheste bisher zweifelsfrei nachgewiesene Störung, die durch *Lep<sup>rfa</sup>* verursacht wird. Bisher konnten als früheste physiologische Auswirkung der *Lep<sup>rfa</sup>*-Mutation Unterschiede im Körperfettgehalt nachgewiesen werden, die bei 4-7 Tage alten Tieren erstmals signifikant werden (Meierfrankenfeld et al. 1996, Olbort 1998). Weder fetale und neonatale Plasmainsulinkonzentration und Leberglykogengehalt, noch der totale Körperfettgehalt und der Triglyzeridgehalt von BAT, WAT und Leber im Alter von 24 h differierten zwischen  $+/fa$  und  $fa/fa$  Tieren (Meierfrankenfeld et al. 1996).

Pränatal konnte dagegen bei den Welpen, die durch Kaiserschnitt zwischen 3 und 24 h vor dem errechneten Geburtstermin entwickelt wurden, kein signifikanter Gendosis-Effekt auf den Plasmaleptinspiegel festgestellt werden. Auffallend war jedoch, daß Tiere aus Würfen, die ca. 5 h vor dem errechneten Geburtstermin per Kaiserschnitt entwickelt worden waren, bei gleichem Genotyp deutlich höhere Plasmaleptinspiegel aufwiesen als Tiere aus Würfen, die ca. 3 h vor dem errechneten Geburtstermin entwickelt worden waren. Dies warf die Frage auf, ob die beobachteten Wurfunterschiede Folge einer starken zeitlichen Änderung des Plasmaleptinspiegels in den letzten Stunden vor der Geburt sein könnten. Die Tiere, die ca. 24 h vor dem errechneten Geburtstermin per Kaiserschnitt entwickelt wurden, zeigten allerdings eine weniger extreme Verschiebung in obere Bereiche. Im Gegensatz zu den postnatal und ca. 3 h pränatal vor dem errechneten Geburtstermin

bestimmten Werten der  $+/+$  und  $+/-$  Tieren fiel aber auf, daß 24 h pränatal keine Plasmaleptinwerte unter 2 ng/ml auftraten.

Herrera et al. 2000 konnten bei Ratten in den letzten beiden Tagen des intrauterinen Lebens einen Abfall des Plasmaleptinspiegels von Tag 20 auf Tag 21 nachweisen. Trotz dieser fallenden Tendenz des Plasmaleptinspiegels bei Betrachtungen von 24 h Intervallen, kann aber nicht ausgeschlossen werden, daß es zwischen 24 und 3 h vor der Geburt dennoch zu einer vorübergehenden Erhöhung des Plasmaleptinspiegels kommen könnte. Zudem könnten die raschen Veränderungen des Plasmaleptinspiegels in solchen dynamischen Phasen dazu führen, daß Gendosis-Effekte verdeckt werden. Aufgrund der beschränkten Anzahl der für Kaiserschnitte zur Verfügung stehenden Zuchttiere konnte diese Vermutung in der vorliegenden Arbeit jedoch nicht geklärt werden. Bei der hierzu nötigen Auswertung von Kurzzeitintervallen ( $\leq 1$ h) bestände zudem die Schwierigkeit, daß die zu erwartenden individuellen Geburtstermine nicht exakt bestimmt werden könnten.

Die Herkunft des im perinatalen Zeitraum im fetalen/neonatalen Blutkreislauf zirkulierenden Plasmaleptins ist noch nicht vollständig geklärt. Vorläufige unveröffentlichte Ergebnisse zeigten, daß die Leptin-mRNA-Konzentration im BAT positiv mit den Plasmaleptinspiegeln zum Zeitpunkt der Geburt korreliert ist (Zhang, unveröffentlicht). Dies steht in Übereinstimmung mit der Tatsache, daß das BAT das erste Fettgewebe ist, welches während der Entwicklung erscheint und bei den meisten Spezies zum Zeitpunkt der Geburt vorhanden ist (Dessolin et al. 1997, Herrera et al. 2000). Um zu klären, wie groß der quantitative Beitrag der Leptinproduktion im BAT zum perinatalen Plasmaleptinspiegel ist und ob es noch weitere Leptinproduktionsorte in dieser Altersspanne gibt, bedarf es jedoch weiterer intensiver Studien. Als zusätzliche Quelle des fetalen Plasmaleptins kommen, zumindestens bei der Maus, die noch knorpeligen Anteile des Skeletts in Frage, in denen, genauso wie in Haarfollikeln, Herz und Leber, eine Leptinproduktion nachgewiesen wurde (Hoggard et al. 2000).

Zwischen dem mütterlichen und dem neonatalen Plasmaleptinspiegel scheint beim Mensch kurz nach der Geburt, vor dem Beginn der Laktation, keine Korrelation zu bestehen (Hassink et al. 1997). Die hier vorgelegten Ergebnisse zeigen bei der Ratte unmittelbar nach der Geburt ebenfalls individuell unterschiedliche Plasmaleptinspiegel, die einen regulatorischen Einfluß der Feten auf ihren eigenen Plasmaleptinspiegel belegen. Zudem



konnten in dieser Arbeit bei Tieren des gleichen Genotyps keine Unterschiede im Plasmaleptinspiegel zwischen den Nachkommen von  $+/+$  und  $+/fa$  Müttern festgestellt werden.

Pränatale Untersuchungen zeigten hingegen, daß die Plasmaleptinspiegel der Feten im gleichen Bereich wie die ihrer Mütter lagen und sich ähnlich verhielten, beide fielen von Tag 20 auf Tag 21 (Herrera et al. 2000). Ob hier intrauterin, wenn überhaupt, ein direkter oder indirekter Bezug zwischen mütterlichem und fetalem Plasmaleptinspiegel besteht, ist aber noch fraglich. Vorstellbar ist, daß die *Lep*-Expression in der Plazenta, als direktem Bindeglied zwischen fetalem und mütterlichem Blutkreislauf, an der Leptinsekretion in beide Kreisläufe beteiligt ist. Perfusionsversuche ex vivo beim Mensch zeigten, daß plazentäres Leptin sowohl in die mütterliche als auch in die fetale Blutzirkulation exportiert wird (Hoggard et al. 2001), wobei die *Lep*-Expression der Plazenta einen Beitrag zum maternalen zirkulierenden Leptin liefert (Masuzaki et al. 1997, Senaris et al. 1997). Für die Maus konnte eine Leptin-mRNA-Produktion in der Plazenta in Bereichen nachgewiesen werden, die für den Austausch von Nährstoffen zwischen Fetus und Plazenta sowie für die Verbindung mit dem mütterlichen Gewebe zuständig sind (Hoggard et al. 2000). Bei der Ratte ist der Einfluß der plazentären Leptinproduktion auf den Fetus noch nicht erforscht, und es existieren zur Frage, ob die plazentäre Leptinproduktion den Plasmaleptinspiegel der Muttertiere erhöht, auch nur widersprüchliche Berichte (Amico et al. 1998, Kawai et al. 1997).

Neben eventuellen mütterlichen Einflüssen könnten sich die auffallenden Unterschiede zwischen den prä- und postnatalen Plasmaleptinspiegeln auch durch die unterschiedlichen Umweltbedingungen ergeben. Da die frühesten postnatal nachgewiesenen Unterschiede zwischen *fa/fa* Tieren und  $+/+$  bzw.  $+/fa$  Tieren auf einen erniedrigten sympathischen Antrieb bei den *fa/fa* Tieren zurückzuführen sind (Meierfrankenfeld et al. 1996, Körtner et al. 1994), könnte das Fehlen einer Beziehung zwischen pränatalem Plasmaleptinspiegel und der Gendosis evtl. darauf beruhen, daß aufgrund fehlender Kältestimulation im Uterus, d.h. bei thermoneutralen Umgebungsbedingungen, sich die SAA der  $+/+$ ,  $+/fa$  und *fa/fa* Tiere auf einem sehr niedrigen Niveau bewegt. Durch den Geburtsvorgang selbst und die damit verbundenen metabolischen Veränderungen kommt es bereits in der vorbereitenden, länger andauernden Einleitungsphase zu einer starken sympathischen Aktivierung der Neugeborenen, wodurch sich Gendosis-Effekte im sympathischen Antrieb auf den

Plasmaleptinspiegel der Welpen auswirken könnten. Bei Entnahme des Fetus durch Kaiserschnitt vor Beginn der Austreibungsphase ist hingegen die Zeit zur Aktivierung des SNS durch die Entbindung der Feten zu kurz ( $<15$  min), um die Plasmaleptinspiegel verändern zu können.

#### **4.2. Entwicklungsbedingte Veränderungen des Plasmaleptinspiegels und der Körperzusammensetzung bei Wildtyp-Tieren zwischen der 1. und 5. Lebenswoche**

Die Untersuchungen der Körperzusammensetzung und des Plasmaleptinspiegels bei Wildtyp-Ratten im Alter von 6 bis 34 Tagen bestätigten die bekannten engen Korrelationen verschiedener Körperparameter, wie zwischen FFDM und Feuchtmasse (Meierfrankenfeld et al. 1996, Olbort 1998), und stützten die Feststellung, daß die Körperzusammensetzung bereits in den ersten Lebenstagen eine geregelte Größe ist (Kraeft et al. 1999, Stehling et al. 1997). Aufgrund der im Entwicklungsverlauf zunehmenden Körpermasse erschien der prozentuale Körperfettgehalt im Gegensatz zur Körperfettmasse für diese Arbeit als geeignetere Bezugsgröße, um die Adiposität der unterschiedlich großen Einzeltiere zu reflektieren und entwicklungsbedingte Veränderungen des Plasmaleptinspiegels zu beurteilen. In den ersten beiden Lebenswochen weisen sowohl der Plasmaleptinspiegel wie der auf den Körperfettgehalt bezogene Plasmaleptinspiegel größere Schwankungen auf als in der 3.-5. Lebenswoche. Allerdings erscheinen die Schwankungen nicht so extrem, als daß man sie bei der hier ausgewerteten Altersstufe mit dem bei Mäusen in der zweiten postnatalen Woche vorkommende Leptinsurge vergleichen könnte (Ahima et al. 1998).

Die Möglichkeit, daß es bei der Ratte innerhalb der ersten Lebenswoche eine ähnliche Leptinsurge wie bei der Maus in der zweiten Lebenswoche gibt, läßt sich allerdings nicht völlig ausschließen. Untersuchungen an Ratten zeigten, daß die neonatalen Plasmaleptinspiegel am ersten Lebenstag zunächst ansteigen und am 4. Lebenstag dann wieder deutlich niedriger sind (Herrera et al. 2000). Eingehendere Untersuchungen über die zeitliche Veränderung des Plasmaleptinspiegels in den ersten Lebenstagen liegen derzeit jedoch nicht vor. Es zeigte sich aber in der vorliegenden Arbeit, daß es trotz deutlich höherer Schwankungen des Plasmaleptinspiegels in den ersten beiden Lebenswochen, im Alter von 10 Tagen zu keiner sprunghaften Veränderung des Plasmaleptinspiegels kommt, die experimentelle Untersuchungen zu diesem Zeitpunkt

beeinträchtigen würde. Deshalb war es möglich, die Mechanismen, die der Regulation des Plasmaleptinspiegels und der *Lep*-Expression im WAT und BAT zugrunde liegen, in dieser Alterstufe, für die schon einige Erkenntnisse vorlagen (Zhang et al. 1997, Olbort 1998), intensiver zu erforschen. Außerdem zeigten die methodischen Voruntersuchungen, daß der Zeitpunkt der Blutprobenentnahme bei der Bestimmung des Plasmaleptinspiegels bei 10 Tage alten Tieren unkritisch ist, da keine Unterschiede zwischen den zum Zeitpunkt des circadianen Minimums oder des circadianen Maximums des Tc-Rhythmus bestimmten Werte auftraten.

### **4.3. Regulation des Plasmaleptinspiegels**

#### **4.3.1. Veränderung von Gendosis-Effekten durch thermische und nutritive Manipulationen**

Die in dieser Arbeit durchgeführten vergleichenden Untersuchungen an 10 Tage alten, normal unter intermittierender Kältebelastung aufgezogenen  $+/+$ ,  $+/fa$  und  $fa/fa$  Rattenwelpen bestätigten die bekannten Gendosis-abhängigen Anstiege im Körperfettgehalt und im Plasmaleptinspiegel (Schwarzer et al. 1997, Zhang et al. 1997, Olbort 1998). Durch experimentelle Manipulationen der thermischen und nutritiven Bedingungen wurden in dieser Arbeit nun die Ursachen für die Veränderung der Beziehung zwischen Plasmaleptinspiegel und Körperfettgehalt durch den defekten Leptinrezeptor eingegrenzt und damit auch die grundlegenden Mechanismen für die Regulation des Plasmaleptinspiegels im allgemeinen herausgearbeitet.

##### **4.3.1.1. Methodische Erwägungen**

Um die Auswirkungen veränderter thermischer und nutritiver Bedingungen während der künstlichen Aufzucht im Vergleich zu den Werten unter den bei normaler Aufzucht herrschenden thermischen Bedingungen - einer moderaten Kältebelastung - korrekt beurteilen zu können, war es wichtig, zu überprüfen, welchen Einfluß die künstliche Aufzucht selbst auf die untersuchten Größen hat. So zeigten Korrelationen zwischen Plasmaleptinspiegel und Körperfettgehalt für die unter Kältebelastung aufgezogenen Tiere eine deutliche Verschiebung der Werte normal aufzogener  $+/fa$  Tiere nach oben im Vergleich zu den unter Kältebelastung künstlich aufgezogenen Tieren des gleichen Genotyps. Dagegen zeigte der Vergleich von normal und künstlich unter Kältebelastung

aufgezogenen *fa/fa* Tieren ähnlich stark erhöhte Plasmaleptinspiegel gegenüber ihren jeweiligen *+/+* und *+/fa* Wurfgeschwistern. Die künstliche Aufzucht an sich verändert also nicht die deutlich höheren Plasmaleptinwerte der *fa/fa* Tiere gegenüber ihren *+/+* und *+/fa* Wurfgeschwistern.

Bei der geringen Anzahl der künstlich unter Kältebelastung aufgezogenen Tiere ließen sich keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen *+/+* und *+/fa* Tieren nachweisen. Da die künstliche Aufzucht ein sehr schwieriges und äußerst arbeitsaufwendiges Verfahren ist, das eine entsprechende Vergrößerung der N-Zahl nicht gestatten würde, wurden deshalb die weiteren Untersuchungen auf die deutlicheren und auch bei geringer N-Zahl beurteilbaren Unterschiede zwischen *+/fa* und *fa/fa* Tieren beschränkt. Aber auch hierbei muß berücksichtigt werden, daß aufgrund der starken Wurfunterschiede zwischen Tieren diesen Alters ein statistischer Vergleich der Mittelwerte nur innerhalb der gleichen Versuchsgruppe, aber nicht zwischen den Gruppen zulässig ist. Somit sind zunächst nur qualitative Aussagen über die Unterschiede zwischen den Gruppen mit verschiedenen thermischen und nutritiven Bedingungen möglich. Statistische Vergleiche über die Gruppengrenzen hinweg waren nur über den Umweg von Regressionsanalysen möglich, da hierbei, wie an anderer Stelle ausführlich erläutert (Kraeft et al. 1999), den Unterschieden im Wachstum der Tiere aus verschiedenen Würfen Rechnung getragen wird.

#### **4.3.1.2. Effekte der SAA und unbekannter Faktoren**

Bekannt war, daß die thermoneutrale Aufzucht von Ratten im Alter zwischen 4 und 16 Tagen den durch das SNS vermittelten Energieverbrauch minimiert und die Unterschiede im Energiestoffwechsel zwischen *+/+*, *+/fa* und *fa/fa* Tieren eliminiert, die bei Kältebelastung auftreten (Kaul et al. 1990, Markewicz et al. 1993). In der vorgelegten Arbeit konnte darüber hinausgehend gezeigt werden, daß bereits eine kurzfristige Reduktion der sympathisch vermittelten thermoregulatorischen Thermogenese durch zweitägige Aufzucht unter thermoneutralen Bedingungen zu einem starken Abfall der Plasmaleptinspiegel der *fa/fa* Tiere gegenüber den Werten bei Kältebelastung führt, ohne daß sich der Körperfettgehalt in dieser kurzen Zeit ändert. Erst längere thermoneutrale Haltung über 6 Tage läßt den Gesamtkörperfettgehalt und den Plasmaleptinspiegel der *+/fa* Tiere in den Bereich ihrer *fa/fa* Wurfgeschwister ansteigen und eliminiert die vorher immer noch nachweisbaren Unterschiede im Plasmaleptinspiegel von *+/fa* und *fa/fa* Tieren vollständig.

Die Reaktionen auf die Erhöhung der SAA zeigen umgekehrt, daß bereits niedrige Noradrenalin-Dosen ausreichen, um eine Angleichung der Plasmaleptinspiegel von  $+/fa$  und  $fa/fa$  Tieren auf einem ähnlich niedrigem Niveau zu erzielen, wiederum ohne daß eine vorausgehende Reduzierung des Gesamtkörperfettgehaltes erforderlich ist. In diesem Fall reagieren also die  $+/fa$  und  $fa/fa$  Tiere in der - aufgrund früherer Befunde zur Wirkung der Aktivität des SNS auf die *Lep*-Expression adulter Tiere (Trayhurn et al. 1995 b) - erwarteten Weise. Entsprechend dieser Befunde hätte man andererseits erwartet, daß eine Minimierung der SAA durch thermoneutrale Haltung den Plasmaleptinspiegel von  $+/+$  und  $+/fa$  Tieren erhöhen würde, während aufgrund der spontan niedrigen SAA von  $fa/fa$  Tieren keine Reduktion des Plasmaleptinspiegels beim Übergang zu thermoneutralen Bedingungen zu erwarten gewesen wäre. Die vorgelegten Ergebnisse zeigen somit, daß eine Minimierung der SAA durch thermoneutrale Haltung den Energieverbrauch von  $+/fa$  und  $fa/fa$  Tieren nicht nur auf einem minimalen Niveau angleicht, sondern offensichtlich auch Faktoren eliminiert, die für den Anstieg der Plasmaleptinspiegel von kältebelasteten  $fa/fa$  Tieren verantwortlich sind und die unabhängig von Änderungen des Körperfettgehaltes und der SAA kurzfristig wirksam werden.

#### **4.3.1.3. Mögliche Ursachen für die hohen Plasmaleptinspiegel von $fa/fa$ Tieren unter Kältebelastung**

Normal aufgezogene Tiere sind einer intermittierenden Kältebelastung ausgesetzt. Im Gegensatz zu Wildtyp-Tieren reagieren die  $fa/fa$  Jungtiere darauf aber spontan nur sporadisch und schwach mit der sympathischen Aktivierung ihrer Wärmeproduktion und sind dadurch deutlich hypotherm im Vergleich zu ihren Wurfgeschwistern (Markewicz et al. 1993, Schwarzer et al. 1997, Kaul et al. 1990). Die Plasmaleptinspiegel der unter einer entsprechenden Kältebelastung künstlich aufgezogenen  $fa/fa$  Tiere sind aber trotz ihrer gedrosselten sympathisch vermittelten Wärmeproduktion im Vergleich zu den thermoneutral aufgezogenen  $fa/fa$  Tieren bei ähnlich niedriger SAA und gleichem Körperfettgehalt deutlich höher. Die sehr hohen Plasmaleptinspiegel ( $>10$  ng/ml) der kältebelasteten  $fa/fa$  Welpen sind mit Leptin-mRNA-Konzentrationen im WAT und vor allem im BAT assoziiert, die ähnlich oder niedriger als die der Welpen waren, die unter thermoneutralen Bedingungen gehalten wurden. Diese Ergebnisse lassen vermuten, daß der Plasmaleptinspiegel der kältebelasteten  $fa/fa$  Welpen zusätzlich über Mechanismen beeinflusst wird, die weder durch die Leptin-mRNA-Konzentration im BAT und WAT, noch durch die SAA bestimmt werden. Da die thermischen Bedingungen zwischen den

beiden Versuchsgruppen deutlich voneinander abweichen, könnten zum einen direkte oder indirekte metabolische Veränderungen, ausgelöst durch die Hypothermie der kältebelasteten *fa/fa* Tiere, für die überhöhten Plasmaleptinspiegel verantwortlich sein.

Vorstellbar ist eine Veränderung der Clearance des zirkulierenden Leptins als Grundlage dieses Effektes. Es wurde gezeigt, daß die Niere der Hauptfaktor für die Clearance des zirkulierenden Leptins durch glomeruläre Filtration ist (Cumin et al. 1996, 1997, Van Heek et al. 1996). Hypothermie erniedrigt den renalen Blutfluß und die glomeruläre Filtrationsrate durch nicht sympathisch vermittelte Mechanismen (Broman und Kallskog 1995, Chapman et al. 1975). So könnte eine erniedrigte Clearance des zirkulierenden Leptins an dem markanten Anstieg des Plasmaleptinspiegels in hypothermischen relativ zu euthermischen *fa/fa* Welpen beteiligt sein.

Der Plasmaleptinspiegel könnte aber auch durch stimulierende Einflüsse auf die offensichtlich unter bestimmten physiologischen Bedingungen von der Leptin-mRNA-Produktion unabhängige Leptinsekretion (Dallmann et al. 1999) beeinflußt werden. Hier könnte z.B. das Fehlen von Signalen eine Rolle spielen, die von der aktiven thermoregulatorischen Thermogenese bei Wildtyp-Tieren ausgehen und in einer Rückkopplungsschleife die Leptinproduktion und damit die durch Leptin vermittelte Wirkung auf den Stoffwechsel begrenzen. Dies gilt insbesondere angesichts des dominierenden Einflusses der *Lep*-Expression im thermogenetisch hochaktiven BAT auf den Plasmaleptinspiegel in diesem Alter. Allerdings haben die Vorgänge, die zu Änderungen der Leptin-Translation und -Sekretion beitragen könnten, bisher nur wenig Aufmerksamkeit gefunden, so daß keine konkreten Hinweise auf einen möglichen Mechanismus vorliegen.

#### **4.3.2. Physiologische Kontrolle des Plasmaleptinspiegels**

Aufgrund der offensichtlich sowohl von der Leptin-mRNA-Konzentration im BAT und WAT wie von den Veränderungen der SAA unabhängigen Einflüsse wurden die Werte der *fa/fa* Tiere mit einem Plasmaleptinspiegel über 10 ng/ml nicht gemeinsam mit den restlichen Werten bei der Analyse der Zusammenhänge zwischen dem Plasmaleptinspiegel und den verschiedenen untersuchten Variablen betrachtet. Die Analyse der Einflüsse der untersuchten physiologischen Parameter auf Plasmaleptinspiegel unter 10 ng/ml - zunächst unter Ausschluß der Leptin-mRNA-Konzentration im BAT und WAT als intervenierenden

Variablen - zeigte, daß der bekannte positive Einfluß des Körperfettgehaltes auf den Plasmaleptinspiegel mehr als 50% der Variabilität erklärt und bestätigte zudem einen zusätzlichen negativen Einfluß der SAA auf den Plasmaleptinspiegel, der weitere 10% der Variabilität erklärt. Bei dieser Form der Analyse zeigte der Genotyp keine Auswirkung auf den Plasmaleptinspiegel. Wenn der Plasmaleptinspiegel jedoch als Funktion der Leptin-mRNA-Konzentration im WAT und BAT betrachtet wird, hat der Genotyp - auch für die Plasmaleptinwerte <10 ng/ml - einen, allerdings nur schwachen (<10%) Einfluß auf die Variabilität des Plasmaleptinspiegels. Dies läßt die Vermutung zu, daß der Effekt von *Lepr<sup>fa</sup>* auf den Plasmaleptinspiegel, bei Werten unter 10 ng/ml, zumindest teilweise durch Mechanismen verursacht wird, die sich separat von seinem Effekt auf die *Lep*-Expression in BAT und WAT auswirken und, wie die multiple Regressionsanalyse zeigte, vor allem durch Effekte von *Lepr<sup>fa</sup>* auf Energiespeicherung und SAA vermittelt werden.

Da sowohl in Analysen mit wie ohne Berücksichtigung der Leptin-mRNA-Konzentration im BAT und WAT als intervenierenden Variablen nur etwa 70% der Variabilität des Plasmaleptinspiegels erklärt werden konnten, ist anzunehmen, daß der Plasmaleptinspiegel noch durch weitere Faktoren beeinflusst wird, die in den vorgelegten Analysen nicht erfaßt wurden. Es könnte z.B. sein, daß eine *Lep*-Expression außerhalb des Fettgewebes, z.B. im Muskel oder Magen (Bado et al 1998, Morton et al 1998, Wang et al. 1998) oder im Säuglingsalter vielleicht auch noch durch die bei Feten nachgewiesene *Lep*-Expression in Knorpeln und Knochen (Hoggard et al. 2000), an der Leptinproduktion beteiligt ist. Diese Gewebe könnten eventuell am beobachteten, nicht durch die Leptin-mRNA-Konzentration im WAT und BAT vermittelten Effekt von *Lepr<sup>fa</sup>* auf den Plasmaleptinspiegel beteiligt sein. Über die Beiträge dieser potentiellen weiteren Leptinproduktionsorte zum zirkulierenden Plasmaleptinspiegel und die Faktoren, die sie regulieren, liegen aber bisher noch keine Informationen vor.

#### **4.3.3. *Lep*-Expression im BAT und WAT als Quelle für das Plasmaleptin**

Da die Leptin-mRNA-Konzentration pro  $\beta$ -Aktin im hier untersuchten subcutanen WAT unter normalen Aufzuchtbedingungen 2-3 x höher ist als die im BAT, würde man zunächst erwarten, daß die *Lep*-Expression im WAT wie bei den adulten Tieren den entscheidenden Einfluß auf den Plasmaleptinspiegel ausübt. Die Daten von normal und künstlich aufgezogenen 10 Tage alten Tieren zeigten aber übereinstimmend, daß die Leptin-mRNA-Konzentration im BAT etwa 60% der Variation des Plasmaleptinspiegels erklärt und die

des subcutanen WAT nur ca. 5%. Eine mögliche Erklärung hierfür liegt sicherlich darin, daß in diesem Alter die Masse des BAT am Gesamtkörperfettgehalt wesentlich höher ist als die des WAT und dadurch den bestimmenden Einfluß ausübt (Dessolin et al. 1997). Eindrucksvoll zeigt auch die hohe Korrelation zwischen dem Plasmaleptinspiegel und der Leptin-mRNA-Konzentration im BAT im Gegensatz zum WAT den dominierenden Einfluß des BAT.

Im Gegensatz zu den 10 Tage alten Welpen, bei denen die Leptin-mRNA-Konzentration im WAT nur ca. 5% der Variabilität des Plasmaleptinspiegels bestimmt, korreliert bei erwachsenen Tieren der Plasmaleptinspiegel eng mit der Leptin-mRNA-Konzentration und der Masse des WAT (Frederich et al. 1995, Maffei et al. 1995 a, b), das beim Adulten den Hauptteil der Fettmasse ausmacht. Interessanterweise konnte nachgewiesen werden, daß die *Lep*-Expression in verschiedenen WAT-Depots unterschiedlich hoch ist und trotzdem eine hohe Korrelation des Gesamtkörperfettgehaltes mit dem Plasmaleptinspiegel existiert (Maffei et al. 1995, Frederich et al. 1995, Considine et al. 1996). Ähnlich wie bei den hier vorgelegten Untersuchungen zur Koordination der *Lep*-Expression im BAT und subcutanen WAT stellt sich somit die Frage, wie die *Lep*-Expression der verschiedenen WAT-Depots geregelt und koordiniert wird und inwieweit eine Koordination über zentralnervöse Mechanismen daran beteiligt ist (Trayhurn et al. 1998).

#### **4.4. Regulation der *Lep*-Expression im BAT**

##### **4.4.1. Die SAA als dominierende Einflußgröße**

Eine Minimierung der SAA durch thermoneutrale Aufzucht führt in Abhängigkeit von der Dauer zu einem starken Anstieg der Leptin-mRNA-Konzentration im BAT von  $+/fa$  und  $fa/fa$  Tieren, relativ zu den unter Kältebelastung aufgezogenen Tieren. Dabei kommt es zu einer völligen Elimination der Unterschiede zwischen  $+/fa$  und  $fa/fa$ -Tieren. Daß die Leptin-mRNA-Konzentration im BAT nicht zwischen den  $fa/fa$  und  $+/fa$  Tieren differierte, wenn ihre SAA durch thermoneutrale Aufzucht angeglichen wurde, läßt vermuten, daß die durch zentralnervöse LEPR vermittelten Effekte auf die sympathische Aktivität den Hauptmechanismus für die Feedback-Suppression von Leptin auf seine eigene Expression im BAT darstellen. Auch die Noradrenalin-Behandlung demonstriert die starke Wirkung der SAA auf die Leptin-mRNA-Konzentration im BAT durch den dramatischen Abfall und



die Angleichung der Werte von *fa/fa* und *+/fa* Tieren auf einem sehr niedrigen Niveau, unabhängig von Veränderungen der Nettoenergiezufuhr und des Gesamtkörperfettgehaltes.

Das Ergebnis der multiplen linearen Regressionsanalyse bestätigte eindrucksvoll den dominierenden Einfluß der SAA für die Regulation der *Lep*-Expression im BAT. Die als Surrogatvariable für die SAA verwendete MR erklärte fast 90% der Variabilität der Leptin-mRNA-Konzentration im BAT von 10 Tage alten Tieren. Zusätzlich zeigte sich ein geringer Einfluß der Körperfettmasse und der akuten Nettoenergiezufuhr ohne einen signifikanten Genotypeinfluß. Die einfache lineare Korrelationsanalyse zwischen der MS-MR und der Leptin-mRNA-Konzentration im BAT zeigte, daß auch die *fa/fa* Tiere mit einem Plasmaleptinspiegel  $>10$  ng/ml und der nicht in die statistische Auswertung einbezogene Wurf #8 praktisch die gleiche Beziehung aufweisen. Mit einem  $r$  von 0,92 ergab sich dabei eine beeindruckend enge Korrelation zwischen der MS-MR und der Leptin-mRNA-Konzentration im BAT (Abbildung 16 C), ohne daß sich Genotypunterschiede andeuteten.

#### 4.4.2. Methodische Erwägungen

Die Verwendung der MR als Surrogatvariable für die SAA ist bei Jungtieren diesen Alters durch verschiedene Voruntersuchungen gerechtfertigt, die eine sehr enge Beziehung zwischen der MS-MR und dem sympathisch vermittelten Antrieb der Thermogenese im BAT zeigten (Redlin et al. 1992, Körtner et al. 1993). Die außergewöhnlich enge Korrelation zwischen der MS-MR und der Leptin-mRNA-Konzentration im BAT, also zwischen zwei in verschiedenen Labors unabhängig voneinander gemessenen Größen, die beide anfällig für vielerlei Meßfehler sind, ist nicht nur ein Maß für die Qualität der durchgeführten Messungen, sondern weist auch darauf hin, daß diese Beziehung nur einer äußerst geringen biologischen Variabilität unterworfen ist. Ähnlich enge Beziehungen sind beim Adulten, bei denen vielfältige andere physiologische Parameter neben der sympathisch vermittelten Thermoregulation einen großen Einfluß auf die MR haben, nicht zu erwarten (Redlin et al. 1992, Körtner et al. 1993). Die Untersuchung an Jungtieren unter den streng kontrollierten Umweltbedingungen der künstlichen Aufzucht bot somit für die Untersuchung der Einflüsse der SAA auf den Plasmaleptinspiegel ideale Bedingungen. Die hier durchgeführten multiplen Regressionsanalysen zwischen systemphysiologischen Parametern und der Leptin-mRNA-Konzentration im Gewebe individueller Tiere stellen

zudem einen völlig neuen Analyseansatz für die Ermittlung der die Gen-Expression kontrollierenden Variablen dar, der ein großes Potential für die Aufklärung komplexer hormoneller Regulationsvorgänge bietet.

Die erhöhte Leptin-mRNA-Konzentration im BAT von *fa/fa* Tieren unter Kältebelastung stand nicht mit einem generellen Anstieg der Gentranskriptionsraten in Verbindung, da im BAT die UCP1- und  $\alpha$ 2-mRNA-Konzentration zwischen den normal von der Mutter aufgezogenen *fa/fa* und *+/fa* Tieren nicht signifikant differierten (Zhang et al. 2001). Das Nichtvorhandensein eines Effektes von *Lep<sup>fa</sup>* auf die UCP1-mRNA-Konzentration im BAT von 10 Tage alten *fa/fa* Welpen stimmt mit früheren Berichten überein, in denen gezeigt wurde, daß die erniedrigte thermoregulatorische Thermogenese von wenige Tage alten *fa/fa* Welpen nicht auf einer niedrigeren UCP1-Konzentration, sondern auf einer erniedrigten GDP-Bindung, als Maß für die akute Entkopplung der BAT Mitochondrien, beruht (Ashwell et al. 1985, Bazin et al. 1984, 1985). Bei älteren *fa/fa* Ratten wurde im Gegensatz zu den juvenilen Tieren aber eine signifikant erniedrigte UCP1-mRNA- bzw. Proteinkonzentration relativ zu *+/+* bzw. *+/fa* Tieren gefunden, die sich somit vermutlich sekundär ausbildet (Ricquier et al. 1986).

## **4.5. Regulation der *Lep*-Expression im WAT**

### **4.5.1. Die zellulären Energieströme als dominierender Faktor**

Im Gegensatz zum BAT führte eine Erhöhung der SAA im WAT nur dann zu einer Erniedrigung der Leptin-mRNA-Konzentration bei *+/fa* und *fa/fa* Tieren, wenn gleichzeitig der Gesamtkörperfettgehalt und die akute Nettoenergiezufuhr erniedrigt waren. Dieser starke Unterschied in der *Lep*-Expression im WAT zwischen den zwei mit Noradrenalin behandelten Gruppen läßt darauf schließen, daß die Veränderungen des Lipidgehaltes und/oder der Energieströme in den Adipozyten, die sich durch die experimentelle Manipulation der Nettoenergiezufuhr ergeben, eine wichtige Rolle bei der Regulation der *Lep*-Expression im WAT von 10 Tage alten Rattenwelpen spielen. Nur wenn die Noradrenalin-Behandlung mit einer Verringerung der Fettspeicherung und/oder einer Verminderung des Energieeinstroms in die Zellen des WAT verbunden ist, scheint es zur Drosselung der *Lep*-Expression zu kommen. Gleichzeitig zeigt die offensichtliche Insensitivität der Leptin-mRNA-Konzentration im WAT der *fa/fa* Tiere gegenüber der Noradrenalin-Behandlung per se, daß ihre spontan niedrige SAA nicht die primäre Ursache

für die hohe *Lep*-Expression im WAT von normal oder künstlich unter Kältebelastung aufgezogenen *fa/fa* Welpen sein kann. Außer den oben besprochenen Faktoren, die neben der *Lep*-Expression im BAT und WAT zur Hyperleptinämie der kältebelasteten *fa/fa* Tiere beitragen, scheint somit auch die erhöhte *Lep*-Expression im WAT dieser Tiere nicht primär durch die SAA determiniert zu sein. Bestätigend zeigte die multiple lineare Regressionsanalyse, daß die Leptin-mRNA-Konzentration im WAT sowohl von *+/fa* wie von *fa/fa* Tieren nicht durch die SAA, sondern hauptsächlich durch die akute Nettoenergiezufuhr bestimmt wird, während der Einfluß der Fettmasse dagegen auch nur schwach ausgeprägt ist. Dies weist darauf hin, daß der akute Energieeinstrom eine wichtigere Rolle für die *Lep*-Expression im WAT spielt als der Lipidgehalt in den Adipozyten.

#### 4.5.2. Methodische Erwägungen

Es muß aber betont werden, daß im Gegensatz zu der engen Kontrolle der Leptin-mRNA-Konzentration im BAT durch die betrachteten Variablen ( $R^2 = 0,93$ ), diese im WAT sehr schwach ist ( $R^2 = 0,53$ ), und zwar für die *+/fa* Tiere noch weniger ausgeprägt ( $R^2 = 0,48$ ) als für die *fa/fa* Tiere ( $R^2 = 0,59$ ). Dies läßt vermuten, daß ein oder mehrere andere Faktoren, die in der vorgelegten Arbeit nicht erfaßt wurden, an der Vermittlung der Regulation der *Lep*-Expression im WAT beteiligt sind. Dies ist eigentlich nicht erstaunlich, da die als Surrogatvariable für die zellulären Energieströme betrachtete akute Nettoenergiezufuhr sicher wesentlich weniger eng mit dem Energiefluß im WAT assoziiert ist, als die Surrogatvariable MR mit der sympathischen Aktivierung des BAT. Insbesondere muß berücksichtigt werden, daß andere Organe und insbesondere das thermogenetisch aktive BAT mit dem WAT um die zugeführte Nettoenergie konkurrieren. Außerdem sind die zeitlichen Zusammenhänge zwischen der akuten Änderung der Nettoenergiezufuhr und den zellulären Energieströmen im WAT sowie die Auswirkung dieser Veränderungen auf die Leptin-mRNA-Konzentration unbekannt. Es wird also noch intensiver weiterer Studien bedürfen, um die Wirkung der hier für die Regulation der *Lep*-Expression als besonders wichtig erkannten Signale der Energieströme im WAT näher zu analysieren.

## **4.6. Vergleich der Wirkung von Änderungen der SAA auf die *Lep*-Expression im BAT und WAT**

### **4.6.1. Unterschiedliche Reaktionen von BAT und WAT**

Frühere Studien hatten gezeigt, daß akute Kältebelastung oder die Gabe von Katecholaminen oder  $\beta$ 3-Adrenorezeptor-Agonisten die *Lep*-Expression im BAT und WAT von adulten Wildtyp-Mäusen suppressieren, obwohl der Effekt dieser Manipulationen auf die *Lep*-Expression im WAT wesentlich weniger potent war als im BAT (Evans et al. 1999, Moinat et al. 1995, Trayhurn et al. 1996, Deng et al. 1997). Bei 7-10 Wochen alten Ratten wurden diese Befunde unter Verwendung von  $\beta$ 3-Agonisten bestätigt, allerdings war eine akute Kältebelastung nur in der Lage die *Lep*-Expression im BAT, jedoch nicht im WAT zu senken (Moinat et al. 1995). Andererseits haben Moinat et al. (1995), in Übereinstimmung mit den dieser Arbeit präsentierten Ergebnissen an säugenden Welpen, gezeigt, daß in adulten Ratten eine Futterrestriktion die Leptin-mRNA-Konzentration im WAT in weit größerem Maße erniedrigt als reine Kältestimulation oder Gabe von  $\beta$ 3-Adrenorezeptor-Agonisten. Basierend auf diesen Ergebnissen vermutete Moinat, daß die *Lep*-Expression im WAT vielleicht enger mit Veränderungen im Lipidgehalt der Adipozyten verbunden sei als mit Veränderungen in der SAA an sich. Unter diesen Umständen könnten aber auch andere zelluläre Faktoren, z.B. Veränderungen der Metabolitenspiegel oder Energieströme, die *Lep*-Expression ebenso inhibieren wie Veränderungen des Lipidgehaltes der Adipozyten.

Die SAA beeinflusst zudem die Aktivität der intravasal lokalisierten LPL in den beiden Fettgewebstypen in unterschiedlicher Weise. Im WAT hemmt Noradrenalin die LPL und sorgt dadurch für einen geringeren Einstrom von FFA in die Zelle. Im BAT dagegen aktiviert Noradrenalin die LPL und führt zu einem Einstrom von FFA, falls zirkulierende Triglyzeride vorhanden sind (Trayhurn et al. 1995 b). Dadurch kann es zu einer Umleitung von Metabolitenströmen vom WAT zum BAT kommen. Zudem fördert Noradrenalin im BAT die Oxidation von FFA über den Antrieb der thermoregulatorischen Thermogenese (Page et al. 1971, Foster und Bailey 1976, Robles-Valdes et al. 1976), so daß es auch bei lebhaftem Einstrom von Substraten in die Adipozyten des BAT, aufgrund der hohen Wärmeproduktion, zu einer insgesamt negativen zellulären Energiebilanz kommen kann.

Die meisten Befunde zur Wirkung der sympathischen Aktivität oder der Gabe von  $\beta$ -Adrenorezeptor-Agonisten auf die *Lep*-Expression in adulten Tieren wurden in Experimenten gewonnen, in denen keine Kontrollen der Metabolitenkonzentrationen und -Ströme durchgeführt wurden (Moinat 1995, Trayhurn et al. 1996, Deng et al. 1997, Evans et al. 1999). Daher ist es möglich, daß die beobachteten Effekte der SAA auf die *Lep*-Expression zumindestens teilweise sekundär zu sympatho-adrenergen Veränderungen der Metabolitenkonzentrationen/-ströme bzw. des Verhältnisses von Energieeinstrom zu Energieverbrauch in den Adipozyten sind. Wie oben erwähnt, scheint insbesondere die *Lep*-Expression im subcutanen WAT der Jungtiere empfindlicher auf die akuten Veränderungen der Energiebilanz als auf die der Gesamtfettmenge zu reagieren. So stimmen unsere Ergebnisse an säugenden Welpen mit denen von Moinat an adulten Ratten überein, im Hinblick auf die relativ höhere Sensitivität der *Lep*-Expression im WAT auf Veränderungen des Nährstoffangebotes als auf Veränderungen in der SAA, und dies, obwohl die relativen Größen von BAT und WAT und ihre Beteiligung am Plasmaleptinspiegel deutlich zwischen Ratten im Säuglingsalter und Adulten differieren (Dessolin et al. 1997, Rayner et al. 1997). Die Übereinstimmungen in der Regulation der *Lep*-Expression bei Ratten im Säuglingsalter und Adulten sind besonders interessant, da wesentliche Unterschiede in ihrem Fettstoffwechsel bestehen. Da trotz dieser metabolischen Unterschiede sowohl bei Adulten als auch bei Jungtieren eine hohe Sensitivität der *Lep*-Expression im WAT auf Veränderungen in der Nährstoffversorgung nachgewiesen wurde, könnte hierin die Chance zur Selektion der ausschlaggebenden Signale für die *Lep*-Expression liegen.

Es ist jedoch wichtig anzumerken, daß die vorgelegten Ergebnisse die Möglichkeit einer Regulation der *Lep*-Expression im WAT durch SAA nicht völlig ausschließen, sondern nur die relative Wichtigkeit der zellulären Energieströme in der Kontrolle der *Lep*-Expression im WAT betonen. Die stärkeren Effekte der Kontrolle durch die zellulären Energieströme könnten relativ schwache direkte Effekte der erhöhten SAA auf die *Lep*-Expression im WAT von Welpen maskieren, wenn während der Noradrenalin-Behandlung experimentell eine hohe Nettoenergiezufuhr sichergestellt wird. Zum anderen muß berücksichtigt werden, daß hier nur die *Lep*-Expression im subcutanen WAT analysiert wurde, daß aber auch im Jungtier schon geringe Mengen anderer Depots vorhanden sind und diese im adulten Tier dann wesentlich zur Produktion des zirkulierenden Leptins beitragen.

#### 4.6.2. Unterschiede im Fettstoffwechsel juveniler und adulter Tiere

Im Gegensatz zum Jungtier kommt es bei der adulten Ratte zu einem ausgeprägten Wechsel zwischen Resorptions- und Postresorptionsphasen mit aktiver Lipolyse. In der adulten Ratte ergibt sich die FFA-Konzentration in den Adipozyten bei der normalerweise fettarmen und kohlenhydratreichen Ernährung durch das Wechselspiel der Synthese von FFA und Lipolyse, die durch hormonelle Einflüsse und den akuten Energieumsatz bestimmt werden. Die Ratte im Säuglingsalter befindet sich dagegen normalerweise permanent in der Resorptionsphase, wobei die Nahrung fettreich und kohlenhydratarm ist (Wells 1985, Henning 1981). Die in der Milch vorhandenen Fette mit mittelkettigen FFA (Dils und Parker 1982) werden bereits im Magen resorbiert und bilden die Grundlage eines kontinuierlichen Einstroms von FFA in die Adipozyten. Aufgrund der hohen zirkulierenden Triglyzerid- und FFA-Konzentrationen spielen weder eine Neusynthese von FFA, noch Lipolyse eine wesentliche Rolle (Pillay und Bailey 1982, Tsujikawa und Kimura 1980). Selbst bei einer experimentell induzierten Fastenperiode von 6 h fallen die Plasma-FFA-Konzentrationen ab statt anzusteigen, wie bei adulten Tieren unter entsprechenden Umständen (Planche et al. 1980). Zudem ist bei Ratten im Säuglingsalter aufgrund der großen Anforderungen an die Wärmeproduktion die LPL-Aktivität pro Gramm Gewebe im BAT sehr hoch, wesentlich höher als im auch mengenmäßig noch geringeren WAT (Cryer und Jones 1978 a, b, Planche et al. 1980).

Nach dem oben gesagten ist anzunehmen, daß im Jungtier eine Noradrenalin-Behandlung ohne Reduzierung der Nettoenergiezufuhr durch Hemmung der LPL im WAT eine Reduzierung des FFA-Einstroms, jedoch aufgrund der hohen zirkulierenden Triglyzerid- und FFA-Konzentrationen (Page et al. 1971) keine Netto-Lipolyse bewirkt, also keine zelluläre Energieabgabe auslöst. Im BAT dagegen bewirkt die Noradrenalin-Behandlung durch die Aktivierung der in hoher Konzentration vorhandenen LPL zwar eine Erhöhung des Energieeinstroms, aber gleichzeitig durch den Antrieb der Thermogenese eine Erhöhung der Energieabgabe, die als Signal für die Drosselung der *Lep*-Expression wirken könnte. Außer den Signalen, die die Konzentrationen und/oder der Ein- bzw. Ausstrom von FFA über die Verfügbarkeit von Energie geben, spielt auch der Glucosestoffwechsel eine wichtige Rolle für die Rückmeldung über Energiereserven und -ströme. Die Konzentration von UDP-NAc, eines der Endprodukte des Hexosamin-Biosynthese-Pfades, scheint als zellulärer Sensor für die Energieverfügbarkeit zu dienen und gleichermaßen die Effekte von hohen Glucose- wie von hohen FFA-Konzentrationen auf die Erhöhung der

*Lep*-Expression im Skelettmuskel und im WAT adulter Tiere zu vermitteln. Es scheint naheliegend, daß dieser Metabolit auch als Monitor der zellulären Energieströme im BAT und WAT der juvenilen Ratte eine Rolle spielen könnte.

#### **4.7. Die Rolle der LEPR-vermittelten Feedbackregulation bei der *Lep*-Expression im BAT und WAT**

Die Untersuchungen der *Lep*-Expression im BAT und WAT in dieser Arbeit zeigten, daß bei normal aufgezogenen *fa/fa* Tieren die Leptin-mRNA-Konzentration im BAT und WAT relativ zu ihren *+/+* Wurfgeschwister stark erhöht ist. Dies zeigt, daß Leptin über seinen Rezeptor direkt oder indirekt eine Rolle bei der Kontrolle der *Lep*-Expression in diesem Alter spielt.

Die Effekte von *Lepr* auf SAA und Energieströme bzw. -speicherung in den Adipozyten werden vermutlich hauptsächlich durch die lange Form von LEPR im Hypothalamus vermittelt (Campfield et al. 1995, Tartaglia et al. 1995). Die Leptineffekte auf die zellulären Energieströme im WAT und BAT könnten auch direkt durch LEPR auf den Adipozyten vermittelt werden und so in die Feedbackregulation des Leptins auf seine eigene Gen-Expression involviert sein (May 1982, Shimabukuro et al. 1997, Siegrist-Kaiser et al. 1997, Zhou et al. 1997). Diese peripheren Einflüsse scheinen jedoch nur eine untergeordnete Rolle zu spielen, da die Hyperleptinämie der *fa/fa* Tiere beseitigt werden kann, wenn die Unterschiede in der sympathischen Aktivität korrigiert werden.

Deutlich hervorzuheben ist nochmals, daß der Genotyp keinen signifikanten Einfluß auf die Leptin-mRNA-Konzentration im WAT und BAT hat, wenn Körperfettmasse, SAA und akute Nettoenergiezufuhr in die Regressionsanalyse einbezogen werden. Dies läßt die Vermutung zu, daß LEPR keine direkte, autokrine Wirkung von Leptin auf seine Expression im Fettgewebe 10 Tage alter Ratten vermittelt, sondern daß die bei normal aufgezogenen Tieren beobachtete negative Rückkopplung des Leptins auf seine Expression im BAT auf einer durch die zentralnervösen LEPR vermittelten Wirkungen auf die sympathische Aktivität und im WAT auf einer durch Veränderungen der zellulären Energieströme vermittelten Wirkung beruht.

#### 4.8. Funktionelle Bedeutung des perinatalen und juvenilen Plasmaleptinspiegels

Die Bedeutung der Leptinsignale für die Energie-Homöostase bereits während des frühen postnatalen Lebens von Rattenwelpen zeigt sich durch den Beginn der gesteigerten Fettdeposition in der ersten postnatalen Woche von Welpen, die hetero- oder homozygot für den mutierten LEPR sind (Meierfrankenfeld et al. 1996, Schwarzer et al. 1997, Truett et al. 1995, Zhang et al. 1997). In dieser Altersstufe bewirken Behandlungen mit rekombinatem murinen Leptin bereits einen dosisabhängigen Abfall des Körperfettgehaltes von  $+/+$  Tieren, wohingegen  $+/fa$  Tiere weniger stark und  $fa/fa$  Tiere überhaupt nicht reagieren (Kraeft et al. 1999). Verhaltensstudien und physiologische Messungen bei 1 bis 2 Wochen alten Tieren lassen es sehr unwahrscheinlich erscheinen, daß Leptin in den ersten Tagen des Lebens eine Rolle als Sättigungsfaktor spielt (Buchberger et al. 1996, Stehling et al. 1996). Dagegen wurde klar gezeigt, daß Leptingabe die Amplitude des circadianen Rhythmus der MR verändert, indem es bei zwei Wochen alten Welpen die Stärke und Dauer der torporartigen Absenkungen der MR hemmt (Stehling 1996, 1997). Nach heutigem Erkenntnisstand ist auch beim Adulten die physiologische Aufgabe des Leptins evolutionsbiologisch nicht vornehmlich die eines Sättigungshormons, sondern Leptin signalisiert die Energiereserven des Körpers. Diese Funktion des Leptins ist gerade für den jugendlichen Organismus, in dem die Energiereserven noch gering sind und der sich in einem fortschreitenden Entwicklungs- und Wachstumsprozeß befindet, von weitreichender Bedeutung. Außerdem nimmt man an, daß Leptin eine wichtige Rolle in der fetalen und neonatalen Entwicklung spielt, denn durch Leptin wird die Proliferation verschiedenster Zelltypen stimuliert (siehe Harris 2000). Vermutet wird auch, daß Leptin für neuroendokrine Funktionen in der frühen Entwicklung förderlich sein könnte (Ahima et al. 1997, 2000). Denkbar ist, daß vorübergehende Erhöhungen des Plasmaleptinspiegels während kritischer Phasen der neuronalen Entwicklung einen permanenten Einfluß auf das Gehirn ausüben könnten, wie es für Insulin gezeigt werden konnte (Plagemann et al. 1998, 1999 a, b, c). Der bedeutenden Funktion von Leptin entsprechend, könnte die Gendosis-abhängige perinatale und juvenile Hyperleptinämie, als erste phänotypische Erscheinung der *Lepr<sup>fa</sup>* Mutation, entscheidend für neuroendokrine Abnormalitäten und andere sich später entwickelnde phänotypische Unterschiede zwischen den  $+/+$  und  $+/fa$  Tieren gegenüber ihren  $fa/fa$  Wurfgeschwistern sein.



## 5. Zusammenfassung

Gegenstand der vorliegenden Untersuchungen waren die entwicklungsbedingten Veränderungen des Plasmaleptinspiegels bei Ratten im Säuglingsalter sowie seine physiologische Regulation unter besonderer Berücksichtigung des als „*fa*“-Mutation bezeichneten Leptinrezeptor-Gendefekts. Als Grundlage für die Analyse der durch den Gendefekt bedingten Abweichungen von der Norm wurden methodische Voruntersuchungen an gesunden, sog. Wildtyp-Tieren im Zeitraum zwischen der 1. und 5. Lebenswoche durchgeführt, wobei der Zeitgang des Plasmaleptinspiegels, seine Beziehung zum Körperfettgehalt und speziell sein Verhalten am 10. Lebenstag ermittelt wurde. Auf dieser Grundlage wurde der Einfluß der Gendosis, das heißt, die Auswirkungen des homozygoten (*fa/fa*) oder heterozygoten (*+/fa*) Auftretens des Rezeptor-Gendefekts bzw. seine Abwesenheit beim Wildtyp (*+/+*) analysiert, und zwar zu zwei ontogenetisch definierten Zeitpunkten. Zum einen wurde der Plasmaleptinspiegel im perinatalen Zeitraum auf Abhängigkeiten von der Gendosis untersucht. Zum anderen erfolgte eine eingehende Analyse der Interaktion der Gendosis mit der physiologischen Kontrolle des Plasmaleptinspiegels und mehrerer auf ihn einwirkender Einflußgrößen am 10. Lebenstag, weil aufgrund früherer Befunde zu dieser Zeit mit dem Wirksamwerden der Gendosis als Einflußgröße zu rechnen ist. In diesen Untersuchungen wurden nach vorangehender mehrtägiger Manipulation der Energiezufuhr und der äußeren thermischen Belastung alle für die Energiebilanz relevanten Parameter gemessen, sowie die Größe der Leptin-mRNA-Konzentration im Braunen (BAT) und Weißen (WAT) Fettgewebe als den wesentlichen Bildungsorten des Leptins erfaßt. Bei der Analyse der Meßdaten diente die Metabolische Rate (MR) als Surrogatvariable für die experimentell durch Noradrenalin-Infusion manipulierte sympatho-adrenerge Aktivität (SAA), die Nettoenergiezufuhr, das heißt, die Differenz zwischen den mit der Milch zugeführten und den im Stoffwechsel verbrauchten Energiemengen, als Surrogatvariable für die Gesamtheit der zellulären Energieströme und der Gesamtkörperfettgehalt als Surrogatvariable für den Lipidgehalt der Adipozyten. Die Auswertung der Rohdaten erfolgte mittels zweifaktorieller Varianzanalyse und einfacher sowie multipler Regressionsanalysen und führte zu den folgenden Ergebnissen.

1. Bereits kurz nach der Geburt – noch vor Beginn der Triglyzeridspeicherung – aber nicht pränatal, kann als früheste durch den Leptinrezeptordefekt verursachte Störung ein deutlicher Gendosis-Effekt auf den Plasmaleptinspiegel nachgewiesen werden.

2. Der Plasmaleptinspiegel nimmt bei Wildtyp-Tieren während der ersten beiden Lebenswochen deutlich und danach langsamer ab. Dabei weist der Plasmaleptinspiegel in den ersten beiden Lebenswochen stärkere Schwankungen auf als in der 3.-5. Lebenswoche, jedoch kommt es nicht zu sprunghaften Veränderungen, die den Aussagewert der im Alter von 10 Tagen durchgeführten speziellen Untersuchungen hätten beeinträchtigen können.
3. Eine künstliche Aufzucht unter moderater Kältebelastung eliminiert nicht die hohen Plasmaleptinspiegel der *fa/fa* Tiere gegenüber ihren *+fa* und *+/+* Wurfgeschwistern, die sich bei normaler Aufzucht unter Kältebelastung zeigen.
4. Bereits eine kurzfristige künstliche Aufzucht über 2 Tage unter thermoneutralen Bedingungen gleicht noch vor dem Auftreten von Änderungen des Körperfettgehaltes den Energieverbrauch von *+fa* und *fa/fa* Tieren auf minimalem Niveau einander an und eliminiert Faktoren, die für die überhöhten Plasmaleptinspiegel von *fa/fa* Tieren unter Kältebelastung verantwortlich sind.
5. Eine Dauerbehandlung mit Noradrenalin über 6 Tage führt schon bei niedriger Dosis zu einer Angleichung der Plasmaleptinspiegel von *fa/fa* und *+fa* Tieren, ohne daß damit eine Reduzierung des Gesamtkörperfettgehaltes verbunden sein muß.
6. Es zeigte sich sowohl bei normaler wie künstlicher Aufzucht für Plasmaleptinspiegel  $<10$  ng/ml ein starker Einfluß der Leptin-mRNA-Konzentration im BAT auf den Plasmaleptinspiegel, die 60% seiner Variabilität erklärt, während der Einfluß der Leptin-mRNA-Konzentration im WAT weniger als 10% betrug. Bei dieser Analyse zeigte sich zudem auch ein schwacher Genotyp-Einfluß.
7. Bei Plasmaleptinspiegeln  $>10$  ng/ml, wie sie vor allem bei *fa/fa* Tieren unter Kältebelastung beobachtet wurden, sind Effekte des Leptinrezeptordefekts wirksam, die weder mit der Leptin-mRNA-Konzentration im BAT und WAT, noch mit der SAA in Zusammenhang gebracht werden können.
8. Werden für Plasmaleptinspiegel  $<10$  ng/ml die Einflußvariablen ohne Berücksichtigung der Leptin-mRNA-Konzentration im BAT und WAT als intervenierenden Variablen analysiert, ergibt sich ein positiver Einfluß des Körperfettgehaltes, der mehr als 50% der Variabilität erklärt, und ein negativer

Einfluß der SAA, der weitere 10% der Variabilität erklären kann, jedoch kein Einfluß der Gendosis.

9. Die Leptin-mRNA-Konzentration im BAT ist eng mit der SAA korreliert, sie erklärt 90% ihrer Variabilität. Dagegen konnten die untersuchten Variablen insgesamt nur knapp 50% der Variabilität der Leptin-mRNA-Konzentration im WAT erklären, wobei die Nettoenergiezufuhr die dominierende Einflußgröße darstellte und der Körperfettgehalt, sowie die SAA nur eine geringe Rolle spielten. Dabei muß berücksichtigt werden, daß die Surrogatvariable Nettoenergiezufuhr wesentlich weniger eng mit den Energieströmen im WAT assoziiert ist, als die Surrogatvariable MR mit der sympathisch kontrollierten Aktivierung des BAT.

Diese Ergebnisse lassen sich zusammenfassend wie folgt interpretieren.

- (a) Ein von der Fettspeicherung unabhängiger Einfluß des "fa"-Gendefekts auf die Leptinsekretion ist bereits unmittelbar nach der Geburt nachweisbar.
- (b) Im Alter von 10 Tagen ist eine autokrine, durch den Leptinrezeptor an der Fettzelle selbst vermittelte Regelung der Leptin-Gen-Expression unter dem Einfluß des Plasmaleptinspiegels selbst noch nicht wirksam. Infolgedessen wird die bei normal aufgezogenen Tieren im Alter von 10 Tagen nachweisbare negative Rückkopplung des Leptins auf seine Expression im BAT wahrscheinlich durch zentralnervöse Leptinrezeptoren vermittelt, und zwar über deren Einfluß auf die sympathische Aktivität. Rückkopplungseffekte auf die Expression des Leptin-Gens im WAT resultieren wahrscheinlich, aber nicht ausschließlich aus Veränderungen der Energieströme.
- (c) Außer den in der vorliegenden Untersuchung identifizierten Rückkopplungswirkungen des Leptins auf seine Expression weisen einige Befunde auf weitere unbekannte Regelungsfaktoren hin, die sowohl bei normaler Aufzucht als auch bei künstlicher Aufzucht unter Kältebelastung wirksam sind, jedoch durch die Herstellung thermoneutraler Bedingungen eliminiert werden und deren Störung zur Hyperleptinämie der +/-fa und fa/fa Tiere beiträgt.

## 6. Summary

The investigations of this study were concerned with the ontogenetic changes in plasma concentration of the hormone leptin in suckling-age rats and its physiological regulations with special reference to the so-called „*fa*“ gene defect of the leptin receptor. Analytical studies proceeded from the evaluation of the time course of plasma leptin and its relationship with body fat content during the developmental period between the first and fifth week of life, concentrating in particular on the phase around the 10<sup>th</sup> day of life. Based on these studies the influence of the „gene dose“, i.e., the homozygous (*fa/fa*), and heterozygous (*+/fa*) presence of the gene defect or its total absence in the wildtype animal (*+/+*) on plasma leptin was analyzed at two defined states of ontogeny. First, the influence of gene dose on plasma leptin was determined during the perinatal phase. Second, the roles of gene dose and of several physiological and cellular parameters known to influence plasma leptin were studied at the age of 10 days, because preceding observations had indicated that the gene dose would become effective at this age. In order to delineate the influence of gene dose against those of various metabolic parameters, control of food supply was established by artificial rearing and control of metabolic expenditure either by imposing a mild cold load or by norepinephrine infusion to activate non-shivering thermogenesis. Measurements included plasma leptin and the mRNA concentrations in the brown (BAT) and white (WAT) adipose tissue, metabolic rate (MR) as an estimate of the state of sympatho-adrenal activation (SAA), net energy storage, determined as the difference between the energy supplied with the milk and metabolic energy dissipation, as an estimate of the global energy flux, and body fat content as an estimate of the global lipid content of the adipocytes. Evaluation of the data by subjecting them to 2-way ANOVA and to simple or multiple regression analysis produced the following results.

1. The earliest evidence for an influence of the gene dose on plasma leptin was found immediately after birth, i.e., prior to the start of triglyceride storage, but could not be discovered immediately before birth.
2. The plasma concentration of leptin in wildtype animals declines during the first to fifth week of life. The decline is most rapid during the first 2 weeks and varies more strongly during this period than subsequently. Rapid sustained changes that might have compromised the measurements made in 10 day old pups did not occur at that age.

3. Artificial rearing under moderate cold load conditions does not eliminate the difference between the high plasma levels of the *fa/fa* animals in comparison to *+/fa* and *+/+* animals, as they are observed under natural rearing conditions.
4. Artificial rearing for 2 days in thermoneutral conditions leads to comparable minimum energy consumption without changes in body fat storage in both *fa/fa* and *+/fa* pups and eliminates the stimulatory effects responsible for the high plasma leptin levels in the *fa/fa* animals.
5. Under continuous application of norepinephrine for 6 days in artificially reared pups, low doses are sufficient to adjust plasma leptin of the *fa/fa* pups to the level of *+/fa* pups, and reduction of body fat content is not a prerequisite for this effect.
6. For plasma leptin levels <10 ng/ml, irrespective of raising the animals naturally or artificially, a strong influence of leptin mRNA concentration in the BAT may be stated which explains 60% of plasma leptin variations, while leptin mRNA concentration in the WAT accounts for only 10% of the plasma leptin variations. In addition, a weak genotype effect could be confirmed.
7. For plasma leptin levels >10 ng/ml, which were observed mainly in *fa/fa* pups, body fat content was confirmed to be influential and accounted for 50% of the variations in plasma leptin. The influence of gene dose was neither associated with differences in BAT and WAT leptin mRNA concentrations nor with the state of sympathoadrenal activation.
8. Analysis applied to the control of plasma leptin at levels <10 ng/ml, when leaving out of account the influences of leptin mRNA concentrations in the BAT and WAT, revealed a positive relationship with body fat content accounting for 50% of plasma leptin variations and a negative relationship with the state of sympathoadrenal activation accounting for 10% of the plasma leptin variations, while gene-dose influences could not be detected.
9. Leptin mRNA concentrations in the BAT correlated closely with the state of sympathoadrenal activation which accounted for 90% of their variations. Only 50% of the variations in WAT leptin mRNA concentration could be attributed to any one of the investigated variables, with net energy supply emerging as the dominant parameter and both body fat content and state of sympathoadrenal activity being less influential.

The difference in the control of leptin mRNA concentration in BAT and WAT may be related to the facts that net energy supply is loosely connected to energy flux in the WAT whereas MR as the estimate for the sympathoadrenal state of activity is closely connected to energy flux in the BAT.

The results suggest the following conclusions:

- (a) Immediately after birth the „fa“ gene defect is effective as a factor elevating plasma leptin concentration in rat pups.
- (b) In 10-day-old rat pups autocrine control of leptin production, due to the action of the circulating hormone on leptin receptors of the fat cell as the source of leptin, is not yet effective. Since a feedback relationship between leptin and its production was shown to exist in the BAT at this age, it is most likely established by central nervous leptin receptors ultimately controlling sympathoadrenal activity. For leptin production in the WAT, the available evidence suggests some kind of feedback control of leptin mRNA expression in which local energy flux seems to be involved.
- (c) Apart from the feedback relationships identified in this study between plasma leptin and leptin mRNA expression, circumstantial evidence suggests the involvement of additional unknown control mechanisms which are effective in the conditions of natural as well as artificial rearing involving some degree of cold stress, but are eliminated in thermoneutral conditions.

## 7. Literaturverzeichnis

1. **Ahima, R. S., D. Prabakaran, C. Mantzoros, D. Qu, B. Lowell, E. Maratos-Flier und J. S. Flier.** Role of leptin in the neuroendocrine response to fasting. *Nature* 382(6588):250-2, 1996
2. **Ahima, R. S., J. Dushay, S. N. Flier, D. Prabakaran und J. S. Flier.** Leptin accelerates the onset of puberty in normal fetal mice. *J. Clin. Invest.* 99: 391-395, 1997
3. **Ahima, R. S., D. Prabakaran und J. S. Flier.** Postnatal leptin surge and regulation of circadian rhythm of leptin by feeding. *J. Clin. Invest.* 101: 1020-1027, 1998
4. **Ahima, R. S., C. B. Saper, J. S. Flier und J. K. Elmquist.** Leptin regulation of endocrine systems. *Front. Neuroendocrinol.* 21: 263-307, 2000
5. **Ahima, R. S. und J. S. Flier.** Leptin. *Annu. Rev. Physiol.* 62:413-37, 2000
6. **Amico, J. A., A. Thomas, R. S. Crowley und L. A. Burmeister.** Concentrations of leptin in the serum of pregnant, lactating, and cycling rats and of leptin messenger ribonucleic acid in rat placental tissue. *Life Sci.* 63(16):1387-95, 1998
7. **Ashwell, M., S. Holt, G. Jennings, D. M. Stirling, P. Trayhurn und D. A. York.** Measurement by radioimmunoassay of the mitochondrial uncoupling protein from brown adipose tissue of obese (*ob/ob*) mice and Zucker (*fa/fa*) rats at different ages. *FEBS Lett.* 179: 233-7, 1985
8. **Aw, T.Y. und M. R. Grigor.** Digestion and absorption of milk triacylglycerols in 14-day-old suckling rats. *J. Nutr.* 110(11):2133-40, 1980
9. **Bado, A., S. Levasseur, S. Attoub, S. Kermorgant, J. P. Laigneau, M. N. Bortoluzzi, L. Moizo, T. Lehy, M. Guerre-Millo, Y. Le Marchand-Brustel, M. J. Lewin.** The stomach is a source of leptin. *Nature* 394(6695):790-3, 1998
10. **Baile, C. A., M. A. Della-Fera und R. J. Martin.** Regulation of metabolism and body fat mass by leptin. *Annu. Rev. Nutr.* 20:105-127, 2000
11. **Banks, W. A., A. J. Kastin, W. Huang, J. B. Jaspan und L. M. Maness.** Leptin enters the brain by a saturable system independent of insulin. *Peptides* 17 (2):305-311, 1996

12. **Barsh, G., I. Sadaf Farooqi und S. O’Rahilly.** Genetics of body-weight regulation. *Nature* 404:644-651, 2000
13. **Bazin, R., D. Eteve und M. Lavau.** Evidence for decreased GDP binding to brown-adipose-tissue mitochondria of obese Zucker (*fa/fa*) rats in the very first days of life. *Biochem J.* 221(1):241-5, 1984
14. **Bazin, R., D. Eteve, F. Dupuy und M. Lavau.** Role of brown adipose tissue in the development of genetic obesity in the obese Zucker rat (*fa/fa*). *Reprod. Nutr. Dev.* 25(1B):183-8, 1985
15. **Behre, H. M., M. Simoni und E. Nieschlag.** Strong association between serum levels of leptin and testosterone in men. *Clin. Endocrinol.* 47(2):237-40, 1997
16. **Benito, M., E. Whitelaw und D. H. Williamson.** Regulation of ketogenesis during the suckling-weanling transition in the rat. Studies with isolated hepatocytes. *Biochem. J.* 180(1):137-44, 1979
17. **Berraondo, B. und J. A. Martinez.** Free fatty acids are involved in the inverse relationship between hormone-sensitive lipase (HSL) activity and expression in adipose tissue after high-fat feeding or  $\beta$ 3-adrenergic stimulation. *Obes. Res.* 8(3):255-61, 2000
18. **Bjorbaek, C., J. K. Elmquist, P. Michl, R. S. Ahima, A. van Bueren, A. L. McCall und J. S. Flier.** Expression of leptin receptor isoforms in rat brain microvessels. *Endocrinology* 139 (8) 3485-3491, 1998
19. **Boden, G., X. Chen, J. W. Kolaczynski und M. Polansky.** Effects of prolonged hyperinsulinemia on serum leptin in normal human subjects. *J. Clin. Invest.* 100(5):1107-13, 1997
20. **Broman, M. und O. Kallskog.** The effects of hypothermia on renal function and haemodynamics in the rat. *Acta Physiol. Scand.* 153: 179-84, 1995
21. **Brownlee, K.A.** Statistical theory and methodology in science and engineering. *John Wiley & Sons, Inc., New York, London, Sydney*, 1965
22. **Buchberger, P. und I. Schmidt.** Is the onset of obesity in suckling *fa/fa* rats linked to a potentially larger milk intake? *Am. J. Physiol.* 271(40): R472-R476, 1996



23. **Campfield, L. A., F. J. Smith, Y. Guisez, R. Devos und P. Burn.** Recombinant mouse OB protein: evidence for a peripheral signal linking adiposity and central neural networks. *Science* 269: 546-9, 1995
24. **Carey, G.B.** Mechanisms regulating adipocyte lipolysis. *Adv. Exp. Med. Biol.* 441:157-70, 1998
25. **Casabiell, X., V. Pineiro, R. Peino, M. Lage, J. Camina, R. Gallego, L. G. Vallejo, C. Dieguez und F. F. Casanueva.** Gender differences in both spontaneous and stimulated leptin secretion by human omental adipose tissue in vitro: dexamethasone and estradiol stimulate leptin release in women, but not in men. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 83(6):2149-55, 1998
26. **Chapman, B. J., W. R. Withey und K. A. Munday.** Autoregulation of renal blood flow in dogs at normal body temperature and at 27 degrees C. *Clin. Sci. Mol. Med. Suppl.* 48: 501-8, 1975
27. **Chard, T.** Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology. An Introduction to Radioimmunoassay and Related techniques. *Elsevier Biochem. Amsterdam* Vol. 6, Part 2, , 1982
28. **Chen, H., O. Charlat, L. A. Tartaglia, E. A. Woolf, X. Weng, S. J. Ellis, N. D. Lakey, J. Culpepper, K. J. Moore, R. E. Breitbart, G. M. Duyk, R. I. Tepper und J. P. Morgenstern.** Evidence that the diabetes gene encodes the leptin receptor: Identification of a mutation in the leptin receptor gene in *db/db* mice. *Cell* 84: 491-495, 1996
29. **Chen, S. C., J. P. Kochan, L. A. Campfield, P. Burn und R. J. Smeyne.** Splice variants of the ob receptor gene are differentially expressed in brain and peripheral tissues of mice. *J. of Receptor & Signal Transduction Research* 19(1-4): 245-266, 1999
30. **Chua, S. C., Jr., D. W. White, X. S. Wu-Peng, S. M. Liu, N. Okada, E. E. Kershaw, W. K. Chung, L. Power-Kehoe, M. Chua, L. A. Tartaglia, und R. L. Leibel.** Phenotype of fatty due to Gln269Pro mutation in the leptin receptor (*Lepr*). *Diabetes* 45: 1141-3, 1996
31. **Cinti, S., R. C. Frederich, M. C. Zingaretti, R. De Matteis, J. S. Flier und B. B. Lowell.** Immunohistochemical localization of leptin and uncoupling protein in white and brown adipose tissue. *Endocrinology* 138: 797-804, 1997

32. **Coleman, D. L. und K. P. Hummel.** Effects of parabiosis of normal with genetically diabetic mice. *Am. J. Physiol.* 217(5):1298-304, 1969
33. **Coleman, D. L.** Effects of parabiosis of obese with diabetes and normal mice. *Diabetologia* 9:294-298, 1973
34. **Considine, R. V., M. K. Sinha, M. L. Heiman, A. Kriauciunas, T. W. Stephens, M. R. Nyce, J. P. Ohannesian, C. C. Marco, L. J. McKee, T. L. Bauer et al.** Serum immunoreactive-leptin concentrations in normal-weight and obese humans. *N. Engl. J. Med.* 334(5):292-5, 1996
35. **Considine, R. V. und J. F. Caro.** Leptin and the regulation of body weight. *Int. J. Biochem. & Cell Biol.* 29: 1255-1272, 1997
36. **Cooke, P. S., C. U. Yonemura, S. M. Russell und C. S. Nicoll.** Growth and differentiation of fetal rat intestine transplants: dependence on insulin and growth hormone. *Biol. Neonate* 49: 211-218, 1986
37. **Crouse, J. A., G. E. Elliott, T. L. Burgess, L. Chiu, L. Bennett, J. Moore, M. Nicolson und R. E. Pacifici.** Altered cell surface expression and signaling of leptin receptors containing the fatty mutation. *J. Biol. Chem.* 273(29):18365-73, 1998
38. **Cryer, A. und H. M. Jones.** Changes in the lipoprotein lipase (clearing-factor lipase) activity of white adipose tissue during development of the rat. *Biochem. J.* 172(2):319-25, 1978 a
39. **Cryer, A. und H. M. Jones.** Developmental changes in the activity of lipoprotein lipase (clearing-factor lipase) in rat lung, cardiac muscle, skeletal muscle and brown adipose tissue. *Biochem. J.* 174(2):447-51, 1978 b
40. **Cumin, F., H. P. Baum und N. Levens.** Leptin is cleared from the circulation primarily by the kidney. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.* 20: 1120-1126, 1996
41. **Cumin, F., H. P. Baum und N. Levens.** Mechanism of leptin removal from the circulation by the kidney. *J. Endocrinol.* 155: 577-85, 1997
42. **Cusin, I., A. Sainsbury, P. Doyle, F. Rohner-Jeanrenaud und B. Jeanrenaud.** The ob gene and insulin. A relationship leading to clues to the understanding of obesity. *Diabetes* 44(12):1467-70, 1995

43. **Dallman, M. F., S. F. Akana, S. Bhatnagar, M. E. Bell, S. Choi, A. Chu, C. Horsley, N. Levin, O. Meijer, L. R. Soriano, A. M. Strack und V. Viau.** Starvation: early signals, sensors, and sequelae. *Endocrinology* 140(9):4015-23, 1999
44. **da Silva, B. A., C. Bjorbaek, S. Uotani und J. S. Flier.** Functional properties of leptin receptor isoforms containing the gln-->pro extracellular domain mutation of the fatty rat. *Endocrinology* 139(9):3681-90, 1998
45. **De Matteis, R., K. Dashtipour, A. Ognibene und S. Cinti.** Localization of leptin receptor splice variants in mouse peripheral tissues by immunohistochemistry. *Proc. Nutr. Soc.* 57(3):441-448, 1998
46. **Deng, C., M. Moinat, L. Curtis, A. Nadakal, F. Preitner, O. Boss, F. Assimacopoulos-Jeannet, J. Seydoux, und J. P. Giacobino.** Effects of beta-adrenoceptor subtype stimulation on obese gene messenger ribonucleic acid and on leptin secretion in mouse brown adipocytes differentiated in culture. *Endocrinology* 138: 548-52, 1997
47. **Dessolin, S., M. Schalling, O. Champigny, F. Lonnqvist, G. Ailhaud, C. Dani, und D. Ricquier.** Leptin gene is expressed in rat brown adipose tissue at birth. *Faseb. J.* 11: 382-7, 1997
48. **Devaskar, S. U., C. Ollesch, R. A. Rajakumar, und P. A. Rajakumar.** Developmental changes in *ob* gene expression and circulating leptin peptide concentrations. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 238: 44-7, 1997
49. **De Vos, P., R. Saladin, J. Auwerx und B. Staels.** Induction of *ob* gene expression by corticosteroids is accompanied by body weight loss and reduced food intake. *J. Biol. Chem.* 270(27):15958-61, 1995
50. **Dils, R. R. und D. S. Parker.** Metabolic aspects of lactation and the supply of nutrients to the young. In *C.T. Jones: Biochemical development of the fetus and neonate. Elsevier Amsterdam*, 573-590, 1982
51. **Döring, H., G. Körtner, K. Meyer und I. Schmidt.** Do changes of sympathetically stimulated thermogenesis underlie the developmental changes in the cold defense of rat pups? In: *Integrative and Cellular Aspects of Autonomic Functions: Temperature- and Osmoregulation. Eds K., Pleschka und R. Gerstberger. John Libbey, London*, pp 285-294, 1994

52. **Dörner, G. und A. Plagemann.** Perinatal hyperinsulinism as a possible predisposing factor for diabetes mellitus, obesity and enhanced cardiovascular risk in later life. *Horm. metab. Res.* 26:213-221, 1994
53. **Dryden, S., P. King, L. Pickavance, P. Doyle und G. Williams.** Divergent effects of intracerebroventricular and peripheral leptin administration on feeding and hypothalamic neuropeptide Y in lean and obese (*fa/fa*) Zucker rats. *Clin. Sci. (Lond).* 96(3):307-12, 1999
54. **Eckel, R. H. Lipoprotein lipase.** A multifunctional enzyme relevant to common metabolic diseases. *N. Engl. J. Med.* 320(16):1060-1068, 1989
55. **Elmqvist, J. K., C. Bjorbaek, R. S. Ahima, J. S. Flier und C. B. Saper.** Distributions of leptin receptor mRNA isoforms in the rat brain. *J. Comp. Neurol.* 395(4):535-47, 1998
56. **Eiden, S., G. Preibisch und I. Schmidt.** Leptin responsiveness of juvenile rats: proof of leptin function within the physiological range. *J. Physiol.* 530.1: 131-139, 2001
57. **Evans, B. A., L. Agar und R. J. Summers.** The role of the sympathetic nervous system in the regulation of leptin synthesis in C57BL/6 mice. *FEBS Lett.* 444: 149-54, 1999
58. **Fernando-Warnakulasurya, G. J. P., J. E. Staggars, S. C. Frost und M.A. Wells.** Studies on fat digestion, absorption and transport in the suckling rat. 1). Fatty acid composition and concentrations of major lipid components. *J. Lip. Res.* 22: 668-674, 1981
59. **Ferre, P., A. F. Burnol, A. Leturque, J. Terretaz, L. Penicaud, B. Jeanrenaud und J. Girard.** Glucose utilization in vivo and insulin-sensitivity of rat brown adipose tissue in various physiological and pathological conditions. *Biochem. J.* 233(1):249-52, 1986
60. **Flier, J. S.** What's in a name? In search of leptin's physiologic role. *J. Clin. Endocrinol. Metabol.* 83 (5): 1407-1413, 1998
61. **Foster, P. C. und E. Bailey.** Changes in hepatic fatty acid degradation and blood lipid and ketone body content during development of the rat. *Enzyme* 21(5):397-407, 1976

62. **Frederich, R. C., A. Hamann, S. Anderson, B. Lollmann, B. B. Lowell und J. S. Flier.** Leptin levels reflect body lipid content in mice: evidence for diet- induced resistance to leptin action. *Nat. Med.* 1: 1311-4, 1995
63. **Friedman, J. M.** Obesity in the new millennium. *Nature* 404(6778):632-634, 2000
64. **Gainsford, T., T. A. Willson, D. Metcalf, E. Handman, C. McFarlane, A. Ng, N. A. Nicola, W. S. Alexander und D. J. Hilton.** Leptin can induce proliferation, differentiation, and functional activation of hemopoietic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93:14564-14568, 1996
65. **Gainsford, T. und W. S. Alexander.** A role for leptin in hemopoieses? *Mol. Biotechnol.* 11 (2): 149-158, 1999
66. **Garcia-Mayor, R. V., M. A. Andrade, M. Rios, M. Lage, C. Dieguez und F. F. Casanueva.** Serum leptin levels in normal children: relationship to age, gender, body mass index, pituitary-gonadal hormones, and pubertal stage. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 82(9):2849-55, 1997
67. **Geiser, F.** Reduction of metabolism during hibernation and daily torpor in mammals and birds: temperature effect or physiological inhibition? *J. Comp. Physiol. [B]* 158(1):25-37, 1988
68. **Gettys, T. W., P. J. Harkness und P. M. Watson.** The beta 3-adrenergic receptor inhibits insulin-stimulated leptin secretion from isolated rat adipocytes. *Endocrinology* 137:4054-4057, 1996
69. **Giacobino, J. P.** Beta 3-adrenoceptor: an update. *Eur. J. Endocrinol.* 1995 132(4):377-85, 1995
70. **Good, D. J.** How tight are your genes? Transcriptional and posttranscriptional regulation of the leptin receptor, NPY, and POMC genes. *Horm. Behav.* 37(4):284-298, 2000
71. **Guan, X. M., J. F. Hess, H. Yu, P. J. Hey und L. H. van der Ploeg.** Differential expression of mRNA for leptin receptor isoforms in the rat brain. *Mol. Cell. Endocrinol.* 133 (1):1-7, 1997

72. **Haffner, S. M., H. Miettinen, P. Karhapää, L. Mykkanen und M. Laakso.** Leptin concentrations, sex hormones, and cortisol in nondiabetic men. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 82(6):1807-9, 1997
73. **Halaas, J. L., K. S. Gajiwala, M. Maffei, S. L. Cohen, B.T. Chait, D. Rabinowitz, R. L. Lallone, S. K. Burley und J. M. Friedman.** Weight-reducing effects of the plasma protein encoded by the obese gene. *Science* 269(5223):543-546, 1995
74. **Haluzik, M. M. Markova, J. Jiskra und J. Svobodova.** Is leptin physiologically important in the regulation of hematopoiesis? *Cas. Lek. Cesk.* 139 (9): 259-262, 2000
75. **Hamosh, M.** A review. Fat digestion in the newborn: role of lingual lipase and preduodenal digestion. *Pediatr. Res.* 13(5 Pt 1):615-22, 1979
76. **Hardie, L. J., N. Guilhot und P. Trayhurn.** Regulation of leptin production in cultured mature white adipocytes. *Horm. Metab. Res.* 28(12):685-9, 1996 a
77. **Hardie, L. J., D. V. Rayner, S. Holmes und P. Trayhurn.** Circulating leptin levels are modulated by fasting, cold exposure and insulin administration in lean but not Zucker (*fa/fa*) rats as measured by ELISA. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 223(3):660-5, 1996 b
78. **Harris, R. B. S., E. Hervey, G. R. Hervey und G. Tobin.** Body composition of lean and obese Zucker rats in parabiosis. *Int. J. Obes.* 11: 272-283, 1987
79. **Harris, R. B. S.** Leptin-Much more than a satiety signal. *Annu. Rev. Nutr.* 20:45-75, 2000
80. **Hassink, S. G., E. de Lancey, D. V. Sheslow, S. M. Smith-Kirwin, D. M. O'Connor, R. V. Considine, I. Opentanova, K. Dostal, M. L. Spear, K. Leef, M. Ash, A. R. Spitzer und V. L. Funanage.** Placental leptin: an important new growth factor in intrauterine and neonatal development? *Pediatrics* 100(1):E1, 1997
81. **Henning, S. J.** Postnatal development: coordination of feeding, digestion, and metabolism. *Am. J. Physiol.* 241(3):G199-214, 1981
82. **Herrera, E., M. A. Lasuncion, L. Huerta und A. Martin-Hidalgo.** Plasma leptin levels in rat mother and offspring during pregnancy and lactation. *Biol. Neonate* 78(4):315-20, 2000

83. **Hill, R. A., S. Margetic, G. G. Pegg und C. Gazzola.** Leptin: its pharmacokinetics and tissue distribution. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.* 22(8):765-70, 1998
84. **Hoggard, N., L. Hunter, R. G. Lea, P. Trayhurn und J. G. Mercer.** Ontogeny of the expression of leptin and its receptor in the murine fetus and placenta. *Br. J. Nutr.* 83(3):317-26, 2000
85. **Hoggard, N., J. Crabtree, S. Allstaff, D. R. Abramovich und P. Haggarty.** Leptin secretion to both the maternal and fetal circulation in the ex vivo perfused human term placenta. *Placenta* 22(4):347-52, 2001
86. **Issad, T., C. Coupe, P. Ferre und J. Girard.** Insulin resistance during suckling period in rats. *Am. J. Physiol.* 253(2 Pt 1):E142-8, 1987
87. **Issad, T., P. Ferre, M. Pastor-Anglada, M. A. Baudon und J. Girard.** Development of insulin sensitivity in white adipose tissue during the suckling-weaning transition in the rat. Involvement of glucose transport and lipogenesis. *Biochem. J.* 264(1):217-22, 1989
88. **Janssen, J., N. Huizinga, R. Stolk, D. Grobbee, H. Pols, F. de Jong et al.** The acute effect of dexamethasone on plasma leptin concentrations and the relationships between fasting leptin, the IGF-I/IGF-BP system, dehydroepiandrosterone, androstenedione and testosterone in an elderly population. *Clin. Endocrinol.* 48:621-626, 1998
89. **Kamohara, S., R. Burcelin, J. L. Halaas, J. M. Friedman und M. J. Charron.** Acute stimulation of glucose metabolism in mice by leptin treatment. *Nature* 389: 374-377, 1997
90. **Kaul, R., G. Heldmaier, und I. Schmidt.** Defective thermoregulatory thermogenesis does not cause onset of obesity in Zucker rats. *Am. J. Physiol.* 259: E11-8, 1990
91. **Kawai, M., M. Yamaguchi, T. Murakami, K. Shima, Y. Murata und K. Kishi.** The placenta is not the main source of leptin production in pregnant rat: gestational profile of leptin in plasma and adipose tissues. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 240(3):798-802, 1997
92. **Kennedy, G.C.** The role of depot fat in the hypothalamic control of food intake in the rat. *Proc. Roy. Soc. Lond.* 140:578-592, 1953

93. **Körtner, G., K. Schildhauer, O. Petrova, und I. Schmidt.** Rapid changes in metabolic cold defense and GDP binding to brown adipose tissue mitochondria of rat pups. *Am. J. Physiol.* 264:R1017-1023, 1993
94. **Körtner, G., O. Petrova, S. Vogt, und I. Schmidt.** Sympathetically and nonsympathetically mediated onset of excess fat deposition in Zucker rats. *Am. J. Physiol.* 267: E947-53, 1994
95. **Kolaczynski, J. W., M. R. Nyce, R. V. Considine, G. Boden, J. J. Nolan, R. Henry, S. R. Mudaliar, J. Olefsky und J. F. Caro.** Acute and chronic effects of insulin on leptin production in humans: Studies in vivo and in vitro. *Diabetes* 45(5):699-701, 1996
96. **Kopelman, G.** Obesity as a medical problem. *Nature* 404:643, 2000
97. **Kosaki, A., K. Yamada und H. Kuzuya.** Reduced expression of the leptin gene (*ob*) by catecholamine through a G(S) protein-coupled pathway in 3T3-L1 adipocytes. *Diabetes* 45: 1744-9, 1996
98. **Kraeft, S., K. Schwarzer, S. Eiden, B. Nuesslein-Hildesheim, G. Preibisch, und I. Schmidt.** Leptin responsiveness and gene dosage for leptin receptor mutation (*fa*) in newborn rats. *Am. J. Physiol.* 276: E836-42, 1999
99. **Kristensen, K., S. B. Pedersen und B. Richelsen.** Regulation of leptin by steroid hormones in rat adipose tissue. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 259(3):624-30, 1999
100. **Lahlou, N., K. Clement, J. C. Carel, C. Vaisse, C. Lotton, Y. Le Bihan, A. Basdevant, Y. Lebouc, P. Froguel, M. Roger und B. Guy-Grand.** Soluble leptin receptor in serum of subjects with complete resistance to leptin: relation to fat mass. *Diabetes* 49(8):1347-52, 2000
101. **Landt, M.** Leptin binding and binding capacity in serum. *Clin. Chem.* 46(3):379-84, 2000
102. **Lee, G. H., R. Proenca, J. M. Montez, K. M. Carroll, J. G. Darvishzadeh, J. I. Lee und J.M. Friedman.** Abnormal splicing of the leptin receptor in diabetic mice. *Nature* 379 (6566): 632- 635, 1996



103. **Licinio, J., A. B. Negrao, C. Mantzoros, V. Kaklamani, M. L. Wong, P. B. Bongiorno, P. P. Negro, A. Mulla, J. D. Veldhuis, L. Cearnal, J. S. Flier und P. W. Gold.** Sex differences in circulating human leptin pulse amplitude: clinical implications. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 83(11):4140-7, 1998
104. **Lockwood, E. A. und E. Bailey.** The course of ketosis and the activity of key enzymes of ketogenesis and ketone-body utilization during development of the postnatal rat. *Biochem. J.* 124(1):249-54, 1971
105. **MacDougald, O. A., C. S. Hwang, H. Fan und M. D. Lane.** Regulated expression of the obese gene product (leptin) in white adipose tissue and 3T3-L1 adipocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 92(20):9034-7, 1995
106. **Maffei, M., J. Halaas, E. Ravussin, R. E. Pratley, G. H. Lee, Y. Zhang, H. Fei, S. Kim, R. Lallone und S. Ranganathan.** Leptin levels in human and rodent: measurement of plasma leptin and ob RNA in obese and weight-reduced subjects. *Nat. Med.* 1: 1155-1161, 1995 a
107. **Maffei, M., H. Fei, G. H. Lee, C. Dani, P. Leroy, Y. Zhang, R. Proenca, R. Negrel, G. Ailhaud und J. M. Friedman.** Increased expression in adipocytes of *ob* RNA in mice with lesions of the hypothalamus and with mutations at the *db* locus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 92: 6957-60, 1995 b
108. **Mantzoros, C. S., D. Qu, R. C. Frederick, V. S. Susulic, B. B. Lowell, E. Maratos-Flier und J. S. Flier.** Activation of beta (3) adrenergic receptors suppresses leptin expression and mediates a leptin-independent inhibition of food intake in mice. *Diabetes* 45(7):909-14, 1996
109. **Markewicz, B., G. Kuhmichel und I. Schmidt.** Onset of excess fat deposition in Zucker rats with and without decreased thermogenesis. *Am. J. Physiol.* 265: E478-86, 1993
110. **May, J. M.** Rat adipocyte utilization of different substrates: effects of cell size and the control of lipogenesis. *Lipids* 17: 626-33, 1982
111. **Masuzaki, H., Y. Ogawa, N. Sagawa, K. Hosoda, T. Matsumoto, H. Mise, H. Nishimura, Y. Yoshimasa, I. Tanaka, T. Mori und K. Nakao.** Nonadipose tissue production of leptin: leptin as a novel placenta-derived hormone in humans. *Nat. Med.* 3(9):1029-33, 1997

112. **McConway, M. G., D. Johnson, A. Kelly, D. Griffin, J. Smith und A. M. Wallace.** Differences in circulating concentrations of total, free and bound leptin relate to gender and body composition in adult humans. *Ann. Clin. Biochem.* 37 ( Pt 5):717-23, 2000
113. **McCowen, K. C., J. C. Chow und R. J. Smith.** Leptin signaling in the hypothalamus of normal rats in vivo. *Endocrinology* 139(11):4442-7, 1998
114. **Meierfrankenfeld, B., M. Abelenda, H. Jauker, M. Klingenspor, E. E. Kershaw, S. C. Chua, Jr., R. L. Leibel, und I. Schmidt.** Perinatal energy stores and excessive fat deposition in genetically obese (*fa/fa*) rats. *Am. J. Physiol.* 270: E700-8, 1996
115. **Meierfrankenfeld, B.** Kontrolle des Energiestoffwechsels im Säuglingsalter: Vergleich genetisch fettsüchtiger und normaler Ratten. Dissertation, 1996
116. **Mercer, J. G., N. Hoggard, L. M. Williams, C. B. Lawrence, L. T. Hannah und P. Trayhurn.** Localization of leptin receptor mRNA and the long form splice variant (Ob-Rb) in mouse hypothalamus and adjacent brain regions by in situ hybridization. *FEBS Lett.* 387: 113-116, 1996 a
117. **Mercer, J. G., N. Hoggard, L. M. Williams, C. B. Lawrence, L. T. Hannah, P. J. Morgan und P. Trayhurn.** Coexpression of leptin receptor and preproneuropeptide Y mRNA in arcuate nucleus of mouse hypothalamus. *J. Neuroendocrinol.* 8 (10):733-735, 1996 b
118. **Messer, M., E. B. Thoman, A. Galofre, T. Dallman, P. R. Dallman.** Artificial feeding of infant rats by continuous gastric infusion. *J. Nutr.* 98(4):404-10, 1969
119. **Mitchell, S. E., W. D. Rees, L. J. Hardie, N. Hoggard, M. Tadayyon, J. R. Arch und P. Trayhurn.** ob gene expression and secretion of leptin following differentiation of rat preadipocytes to adipocytes in primary culture. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 230(2):360-4, 1997
120. **Moinat, M., C. Deng, P. Muzzin, F. Assimacopoulos-Jeannet, J. Seydoux, A. G. Dulloo, und J. P. Giacobino.** Modulation of obese gene expression in rat brown and white adipose tissues. *FEBS Lett.* 373: 131-4, 1995
121. **Morton, N. M., V. Emilsson, Y. L. Liu und M. A. Cawthorne.** Leptin action in intestinal cells. *J. Biol. Chem.* 273(40):26194-201, 1998

122. **Mumm, B., R. Kaul, G. Heldmaier und I. Schmidt.** Endogenous 24-hour core temperature and oxygen consumption in week-old Zucker rat pups. *J. Comp. Physiol. B.* 159: 569-575, 1989
123. **Murakami, T., M. Iida und K. Shima.** Dexamethasone regulates obese expression in isolated rat adipocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 214(3):1260-7, 1995
124. **Nedergaard, J. und B. Cannon.** Brown adipose tissue: development and function. In: *Fetal and neonatal physiology*. Eds. R.A. Polin und W.F. Fox. W.B. Saunders Company. pp 478-489, 1998
125. **Nüßlein, B., R. Kaul und I. Schmidt.** Absence of 24-hour core temperature cycle in rat pups artificially reared under thermoneutral conditions. *Thermal Physiology*. Ed. B. Mercer, Elsevier Science Publishers B.V. pp 315-320, 1989
126. **Nüßlein, B.** Der juvenile circadiane Kerntemperatur-Rhythmus von Ratten: Physiologische Grundlagen und synchronisierende Faktoren. Dissertation, 1992
127. **Nuesslein-Hildesheim, B. und I. Schmidt.** Is the circadian core temperature rhythm of juvenile rats due to a periodic blockade of thermoregulatory thermogenesis? *Pflügers Arch.* 427(5-6):450-4, 1994
128. **Nuesslein, B., und I. Schmidt.** Development of circadian cycle of core temperature in juvenile rats. *Am. J. Physiol.* 259: R270-6, 1990
129. **Ogawa Y., H. Masuzaki, N. Isse, T. Okazaki, K. Mori, M. Shigemoto, N. Satoh, N. Tamura, K. Hosoda, Y. Yoshimasa et al.** Molecular cloning of rat obese cDNA and augmented gene expression in genetically obese Zucker fatty (fa/fa) rats. *J. Clin. Invest.* 96(3):1647-52, 1995
130. **Olbort, M.** Auswirkungen von einer und zwei Kopien des Leptinrezeptordefektes fa (fatty) auf die Körperzusammensetzung und den Plasma-Leptinspiegel von Ratten im Säuglingsalter. Dissertation, 1998
131. **Page, M. A., H. A. Krebs und D. H. Williamson.** Activities of enzymes of ketone-body utilization in brain and other tissues of suckling rats. *Biochem. J.* 121(1):49-53, 1971

132. **Patel, B. K., J. I. Koenig, L. M. Kaplan und S. C. Hooi.** Increase in plasma leptin and Lep mRNA concentrations by food intake is dependent on insulin. *Metabolism* 47(5):603-7, 1998
133. **Pelleymounter, M. A.** Leptin and the physiology of obesity. *Curr. Pharmaceut. Des.* 3: 85-98, 1997
134. **Péquignot-Planche, E., P. De Gasquet, A. Boulangé und N.T. Tonnu.** Lipoprotein lipase activity at onset of development of white adipose tissue in newborn rats. *Biochem. J.* 162: 461-463, 1977
135. **Phillips, M. S., Q. Liu, H. A. Hammond, V. Dugan, P. J. Hey, C. J. Caskey und J. F. Hess.** Leptin receptor missense mutation in the fatty Zucker rat. *Nat. Genet.* 13(1):18-9, 1996
136. **Pillay, D. und E. Bailey.** Lipogenesis at the suckling-weaning transition in liver and brown adipose tissue of the rat. *Biochem. Biophys. Acta.* 713(3):663-9, 1982
137. **Plagemann, A., T. Harder, A. Rake, K. Melchior, F. Rittel, W. Rohde und G. Dörner.** Hypothalamic insulin and neuropeptide Y in the offspring of gestational diabetic mother rats. *NeuroReport* 9: 4069-4073, 1998
138. **Plagemann, A., T. Harder, A. Rake, M. Voits, H. Fink, W. Rohde und G. Dörner.** Perinatal elevation of hypothalamic insulin, acquired malformation of hypothalamic galaninergetic neurons, and syndrome x-like alterations in adulthood of neonatally overfed rats. *Brain Res.* 31;836(1-2):146-55, 1999 a
139. **Plagemann, A., T. Harder, A. Rake, U. Janert, K. Melchior, W. Rohde und G. Dörner.** Morphological alterations of hypothalamic nuclei due to intrahypothalamic hyperinsulinism in newborn rats. *Int. J. Dev. Neurosci.* 17(1):37-44, 1999 b
140. **Plagemann, A., T. Harder, U. Janert, A. Rake, F. Rittel, W. Rohde und G. Dörner.** Malformations of hypothalamic nuclei in hyperinsulinemic offspring of rats with gestational diabetes. *Dev. Neurosci.* 21(1):58-67, 1999 c
141. **Planche, E., A. Boulange, P. de Gasquet und N. T. Tonnu.** Importance of muscle lipoprotein lipase in rats during suckling. *Am. J. Physiol.* 238(6):E511-7, 1980

142. **Planche, E. und M. Joliff.** Development of energy expenditure in Zucker rats during the first week of life. Effect of time of measurement. *Reprod. Nutr. Dev.* 27(3): 673-9, 1987
143. **Rayner, D. V., G. D. Dalglish, J. S. Duncan, L. J. Hardie, N. Hoggard und P. Trayhurn.** Postnatal development of the ob gene system: elevated leptin levels in suckling *fa/fa* rats. *Am. J. Physiol.* 273: R446-R450, 1997
144. **Redlin, U., B. Nuesslein und I. Schmidt.** Circadian changes of brown adipose tissue thermogenesis in juvenile rats. *Am. J. Physiol.* 262: R504-8, 1992
145. **Rentsch, J. und M. Chiesi.** Regulation of ob gene mRNA levels in cultured adipocytes. *FEBS Lett.* 379(1):55-9, 1996
146. **Ricquier, D. und P. Hemon.** A study of phospholipids and triglycerides in several tissues of the rat during fetal and neonatal development. *Biol. Neonate* 28: 225-240, 1976
147. **Ricquier, D., F. Bouillaud, P. Toumelin, G. Mory, R. Bazin, J. Arch und L. Penicaud.** Expression of uncoupling protein mRNA in thermogenic or weakly thermogenic brown adipose tissue. Evidence for a rapid beta-adrenoreceptor-mediated and transcriptionally regulated step during activation of thermogenesis. *J. Biol. Chem.* 261(30):13905-10, 1986
148. **Robinson, A. M. und D. H. Williamson.** Physiological roles of ketone bodies as substrates and signals in mammalian tissues. *Physiol. Rev.* 60(1):143-87, 1980
149. **Robles-Valdes, C., J. D. McGarry und D. W. Foster.** Maternal-fetal carnitine relationship and neonatal ketosis in the rat. *J. Biol. Chem.* 251(19):6007-12, 1976
150. **Romijn, H.J., M. A. Hofman und A. Gramsbergen.** At what age is the developing cerebral cortex of the rat comparable to that of the full-term newborn human baby? *Early Hum. Dev.* 26(1):61-7, 1991
151. **Rousseau, V., D. J. Becker, L. N. Ongemba, J. Rahier, J. C. Henquin und S. M. Brichard.** Developmental and nutritional changes of ob and PPAR gamma 2 gene expression in rat white adipose tissue. *Biochem. J.* 15;321 ( Pt 2):451-6, 1997
152. **Sachs, L.** Angewandte Statistik: Statistische Methoden und ihre Anwendung. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1997

153. **Saladin, R., P. De Vos, M. Guerre-Millo, A. Leturque, J. Girard, B. Staels und J. Auwerx.** Transient increase in obese gene expression after food intake or insulin administration. *Nature* 377(6549):527-9, 1995
154. **Schmidt, I., J. Stahl, R. Kaul und H. J. Carlisle.** Cold-rearing normalizes capacity for norepinephrine-stimulated thermogenesis but not body temperature in 16-day-old fatty Zucker rats. *Life Sci.* 38(2):129-36, 1986 a
155. **Schmidt, I., A. Barone und H.J. Carlisle.** Diurnal cycle of core temperature in huddling, week-old rat pups. *Physiol. Behav.* 37(1):105-9, 1986 b
156. **Schmidt, I., C. Schoelch, T. Ziska, D. Schneider, E. Simon und A. Plagemann.** Interaction of genetic and environmental programming of the leptin system and of obesity disposition. *Physiol. Genomics.* 3(2):113-20, 2000
157. **Schubert, M.** Computergestützte Meßdatenerfassung an physiologischen Vorgängen. Diplomarbeit, Fachbereich Elektrotechnik II, Fachhochschule Gießen-Friedberg, 1991
158. **Schwartz, M. W., D. G. Baskin, K. J. Kaiyala und S. C. Woods.** Model for the regulation of energy balance and adiposity by central nervous system. *Am. J. Clin. Nutr.* 69:584-596, 1999
159. **Schwartz, M. W., S. C. Woods, D. Porte Jr., R. J. Seeley und D. G. Baskin.** Central nervous system control of food intake. *Nature* 404, 661-671, 2000
160. **Schwarzer, K., H. Döring und I. Schmidt.** Different physiological traits underlying increased body fat of fatty (*fa/fa*) and heterozygous (*+/fa*) rats. *Am. J Physiol.* 272: E100-6, 1997
161. **Seeley, R. J. und M. W. Schwartz.** Neuroendocrine regulation of food intake. *Acta Paediatr. Suppl.* 428:58-61, 1999
162. **Senaris, R., T. Garcia-Caballero, X. Casabiell, R. Gallego, R. Castro, R. V. Considine, C. Dieguez und F. F. Casanueva.** Synthesis of leptin in human placenta. *Endocrinology* 138(10):4501-4, 1997
163. **Sherwood, N. M. und P. S. Timiras.** A stereotaxic atlas of the developing rat brain. *Berkley: University of California Press*, 1970

164. **Shimabukuro, M., K. Koyama, G. Chen, M. Y. Wang, F. Trieu, Y. Lee, C. B. Newgard und R. H. Unger.** Direct antidiabetic effect of leptin through triglyceride depletion of tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 94: 4637-41, 1997
165. **Shimizu, H., Y. Shimomura, Y. Nakanishi, T. Futawatari, K. Ohtani, N. Sato und M. Mori.** Estrogen increases in vivo leptin production in rats and human subjects. *J. Endocrinol.* 154(2):285-92, 1997
166. **Shintani, M., H. Nishimura, S. Yonemitsu, H. Masuzaki, Y. Ogawa, K. Hosoda, G. Inoue, Y. Yoshimasa und K. Nakao.** Downregulation of leptin by free fatty acids in rat adipocytes: effects of triacsin C, palmitate, and 2-bromopalmitate. *Metabolism.* 49(3):326-30, 2000
167. **Siegrist-Kaiser, C. A., V. Pauli, C. E. Juge-Aubry, O. Boss, A. Pernin, W. W. Chin, I. Cusin, F. Rohner-Jeanrenaud, A. G. Burger, J. Zapf und C. A. Meier.** Direct effects of leptin on brown and white adipose tissue. *J. Clin. Invest.* 100: 2858-64, 1997
168. **Sinha, M. K., I. Opentanova, J. P. Ohannesian, J. W. Kolaczynski, M. L. Heiman, J. Hale, G. W. Becker, R. R. Bowsher, T. W. Stephens und J. F. Caro.** Evidence of free and bound leptin in human circulation. *J. Clin. Invest.* 98 (6): 1277-1282, 1996 a
169. **Sinha, M. K., J. Sturis, J. Ohannesian, S. Magosin, T. Stephens, M. L. Heiman, K. S. Polonsky und J. F. Caro.** Ultradian oscillations of leptin secretion in humans. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 228(3):733-738, 1996 b
170. **Sivan, E., P. G. Whittaker, D. Sinha, C. J. Homko, M. Lin, E. A. Reece und G. Boden.** Leptin in human pregnancy: the relationship with gestational hormones. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 179(5):1128-32, 1998
171. **Sivitz, W. I., S. Walsh, D. Morgan, P. Donohoue, W. Haynes und R. L. Leibel.** Plasma leptin in diabetic and insulin-treated diabetic and normal rats. *Metabolism* 47(5):584-91, 1998
172. **Slieker, L. J., K. W. Sloop, P. L. Surface, A. Kriauciunas, F. LaQuier, J. Manetta, J. Bue-Valleskey und T. W. Stephens.** Regulation of expression of *ob* mRNA and protein by glucocorticoids and cAMP. *J. Biol. Chem.* 271(10): 5301-5304, 1996

173. **Sonnenberg, N., J. D. Bergstrom, Y. H. Ha und J. Edmond J.** Metabolism in the artificially reared rat pup: effect of an atypical rat milk substitute. *J. Nutr.* 112(8):1506-14, 1982
174. **Stehling, O., H. Döring, J. Ertl, G. Preibisch und I. Schmidt.** Leptin reduces juvenile fat stores by altering the circadian cycle of energy expenditure. *Am. J. Physiol.* 271:R177-1774, 1996
175. **Stehling, O., H. Döring, B. Nuesslein-Hildesheim, M. Olbort und I. Schmidt.** Leptin does not reduce body fat content but augments cold defense abilities in thermoneutrally reared rat pups. *Pflügers Arch.* 434:694-697, 1997
176. **Spiers, D. E. und E. R. Adair.** Ontogeny of heterothermy in the immature rat: metabolic and thermal responses. *J. Appl. Physiol.* 60: 1190-1197, 1986
177. **Sztalryd, C. und F. B. Kraemer.** Regulation of hormone-sensitive lipase during fasting. *Am. J. Physiol.* 266(2 Pt 1):E179-85, 1994
178. **Tartaglia, L. A., M. Dembski, X. Weng, N. Deng, J. Culpepper, R. Devos, G. J. Richards, L. A. Campfield, F. T. Clark, J. Deeds, et al.** Identification and expression cloning of a leptin receptor, OB-R. *Cell* 83: 1263-71, 1995
179. **Taylor, P. M.** Oxygen consumption in newborn rats. *J. Physiol.* 154: 153-168, 1960
180. **Taylor, C. B., E. Bailey und W. Bartley.** Changes in hepatic lipogenesis during development of the rat. *Biochem. J.* 105(2):717-22, 1967
181. **Trayhurn, P., M. E. Thomas, J. S. Duncan und D. V. Rayner.** Effects of fasting and refeeding on *ob* gene expression in white adipose tissue of lean and obese (*ob/ob*) mice. *FEBS Lett.* 368(3):488-90, 1995 a
182. **Trayhurn, P., J. S. Duncan und D. V. Rayner.** Acute cold-induced suppression of *ob* (obese) gene expression in white adipose tissue of mice: mediation by the sympathetic system. *Biochem. J.* 311 ( Pt 3):729-33, 1995 b
183. **Trayhurn, P., J. S. Duncan, D. V. Rayner und L. J. Hardie.** Rapid inhibition of *ob* gene expression and circulating leptin levels in lean mice by the beta 3-adrenoceptor agonists BRL 35135A and ZD2079. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 228: 605-10, 1996



184. **Trayhurn, P., J. S. Duncan, N. Hoggard und D. V. Rayner.** Regulation of leptin production: a dominant role for the sympathetic nervous system? *Proc. Nutr. Soc.* 57(3):413-9, 1998
185. **Trayhurn, P., N. Hoggard, J. G. Mercer und D. V. Rayner.** Leptin: fundamental aspects. *Int J Obes Relat Metab Disord Suppl* 1:22-8, 1999
186. **Truett, G. E., R. J. Tempelman und J. A. Walker.** Codominant effects of the *fatty (fa)* gene during early development of obesity. *Am. J. Physiol.* 268: E15-20, 1995
187. **Tsujikawa, M. und S. Kimura.** Changes in lipid synthesis in rat adipose tissue during development. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* 26(4):367-74, 1980
188. **Vaisse, C. , J. L. Halaas, C. M. Horvath, J. E. Darnell Jr., M. Stoffel und J. M. Friedman.** Leptin activation of STAT3 in the hypothalamus of wildtype and *ob/ob* mice but not *db/db* mice. *Nature Gen.* 14, 95-97, 1996
189. **Van Heek, M., D. E. Mullins, M. A. Wirth, M. P. Graziano, A. B. Fawzi, D. S. Compton, C. F. France, L. M. Hoos, R. L. Casale, E. J. Sybertz, C. D. Strader, und H. R. Davis, Jr.** The relationship of tissue localization, distribution and turnover to feeding after intraperitoneal 125I-leptin administration to *ob/ob* and *db/db* mice. *Horm. Metab. Res.* 28: 653-8, 1996
190. **Wabitsch, M., P. B. Jensen, W. F. Blum, C. T. Christoffersen, P. Englaro, E. Heinze, W. Rascher, W. Teller, H. Tornqvist und H. Hauner.** Insulin and cortisol promote leptin production in cultured human fat cells. *Diabetes* 45(10):1435-8, 1996
191. **Wabitsch, M., W. F. Blum, R. Muche, M. Braun, F. Hube, W. Rascher, E. Heinze, W. Teller und H. Hauner.** Contribution of androgens to the gender difference in leptin production in obese children and adolescents. *J. Clin. Invest.* 100(4):808-13, 1997
192. **Wang, J., R. Liu, M. Hawkins, N. Barzilai, und L. Rossetti.** A nutrient-sensing pathway regulates leptin gene expression in muscle and fat. *Nature* 393: 684-8, 1998
193. **Wang, J., R. Liu, L. Liu, R. Chowdhury, N. Barzilai, J. Tan und L. Rossetti.** The effect of leptin on Lep expression is tissue-specific and nutritionally regulated. *Nat. Med.* 5: 895-9, 1999

194. **Wang, M. Y., Y. T. Zhou, C. B. Newgard und R. H. Unger.** A novel leptin receptor isoform in the rat. *FEBS Lett.* 392 (2): 87-90, 1996
195. **Watts, C. und K. R. Gain.** Insulin in the fetus. A new form of circulating insulin. *Diabetes* 33: 50-56, 1984
196. **Wauters, M., R. V. Considine und L. F. van Gaal.** Human leptin: from an adipocyte hormone to an endocrine mediator. *Europ. J. Endocrinol.* 143:293-311, 2000
197. **Wells, M. A.** Fatty acid metabolism and ketone formation in the suckling rat. *Fed. Proc.* 44(7):2365-8, 1985
198. **White, D.W., D. W. Wang, S. C. Chua Jr, J. P. Morgenstern, R. L. Leibel, H. Baumann und L. A. Tartaglia.** Constitutive and impaired signaling of leptin receptors containing the Gln --> Pro extracellular domain fatty mutation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94(20):10657-62, 1997
199. **Williamson, D. H. und B. M. Buckley.** The role of ketone bodies in brain development. In *Hommes F. A. und C. J. van den Berg: Inborn errors of metabolism*, Acad. Press: 81-96, 1973
200. **Withers, P. C.** Measurement of VO<sub>2</sub>, VCO<sub>2</sub>, and evaporative water loss with a flow-through mask. *J. Appl. Physiol.* 42(1):120-3, 1977
201. **World Health Report (WHO),** 1997
202. **Wu-Peng, S., M. Rosenbaum, M. Nicolson, S. C. Chua und R. L. Leibel.** Effects of exogenous gonadal steroids on leptin homeostasis in rats. *Obes. Res.* 7(6):586-92, 1999
203. **Zakrzewska, K. E. , I. Cusin, A. Stricker-Krongrad, O. Boss, D. Ricquier, B. Jeanrenaud und F. Rohner-Jeanrenaud.** Induction of obesity and hyperleptinemia by central glucocorticoid infusion in the rat. *Diabetes* 48(2):365-70, 1999
204. **Zhang, Y., R. Proenca, M. Maffei, M. Barone, L. Leopold, und J. M. Friedman.** Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 372: 425-32, 1994

205. **Zhang, Y., M. Olbort, K. Schwarzer, B. Nuesslein-Hildesheim, M. Nicolson, E. Murphy, T. J. Kowalski, I. Schmidt, und R. L. Leibel.** The leptin receptor mediates apparent autocrine regulation of leptin gene expression. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 240: 492-5, 1997
  
206. **Zhang, Y., C. Hufnagel, S. Eiden, K. Y. Guo, P. A. Diaz, R. Leibel und I. Schmidt.** Mechanisms for LEPR-mediated regulation of leptin expression in brown and white adipocytes in rat pups. *Physiol. Genomics.* 4(3):189-99, 2001
  
207. **Zhou, Y. T., M. Shimabukuro, K. Koyama, Y. Lee, M. Y. Wang, F. Trieu, C. B. Newgard und R. H. Unger.** Induction by leptin of uncoupling protein-2 and enzymes of fatty acid oxidation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 6386-90, 1997

## 8. Danksagung

Zum Abschluß dieser Arbeit möchte ich mich bei allen herzlichen bedanken, ohne deren Unterstützung die Anfertigung dieser Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Als erstes möchte ich mich besonders bei Frau Prof. Dr. Ingrid Schmidt für die Überlassung des Themas und die ausgezeichnete Betreuung sowie ihren unermüdlichen Einsatz während der Anfertigung dieser Arbeit bedanken.

Herrn Prof. Dr. Eckhart Simon danke ich für die Genehmigung, die Arbeit in seiner Abteilung des Max-Planck-Institutes für physiologische und klinische Forschung anfertigen zu dürfen sowie für seine freundliche Unterstützung bei der Lösung von Problemfällen aller Art.

Herrn Prof. Dr. Martin Diener bin ich für die Vertretung der Arbeit am Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Giessen dankbar.

Mein Dank gilt den vielen Kollegen und Kolleginnen aus meiner Arbeitsgruppe, die mich während dieser Arbeit begleitet und unterstützt haben und für ein hervorragendes Arbeitsklima gesorgt haben:

Frau Dr. Barbara Nüßlein-Hildesheim für die intensive Einarbeitung in die Methode der künstlichen Aufzucht und Frau Sandra Eiden für die Einarbeitung in alle anderen anfallenden Arbeiten.

Meinem Lebensgefährten Herrn Heiko Döring für die Einarbeitung in alle technischen Anlagen, insbesondere die für die künstliche Aufzucht, seine stete Bereitschaft, mir in Problemfällen beizustehen, seine Hilfe bei der Formatierung dieser Arbeit und vor allem für seine private Unterstützung.

Frau Diana Fuchs und Frau Roswitha Bender danke ich herzlich für die Durchführung des RIA, sowie Frau Susanne Jursch und Frau Sandra Eiden für die kompetente Durchführung bzw. Überwachung der Genotypisierungen.

Frau Roswitha Bender und Frau Irene Küchenmeister danke ich für die vielen Stunden, in denen sie in mühevoller Handarbeit die erforderlichen Milchkatheter gebogen und die Watteunterlagen für die Welpen angefertigt haben.

Herrn Peter Hess und Herrn Wilhelm Konrad von der Haustechnik danke ich dafür, daß sie mir jederzeit bei technischen oder sonstigen Problemen behilflich waren.

Frau Andrea Fritz danke ich für die kompetente Übernahme meiner Arbeiten für die Arbeitsgruppe und dafür, daß sie mir „den Rücken freigehalten“ hat. Auch Nicole Christ, Alex Steinbrück, Darius Schneider, Corinna Schölch und Sandra Söhler trugen durch ihre freundliche Art und Weise zu einem guten Arbeitsklima bei.

Unserer hauseigenen Werkstatt, besonders Herrn Klaus Burk und Wolfgang Schubert, danke ich für die prompte Ausführung aller anfallenden Arbeiten und für ihre fachliche Unterstützung sowie unserer Personalabteilung, besonders Frau Radermacher, für ihren Einsatz.

Mein größter Dank gilt meinen Eltern, Inge und Udo Hufnagel, die mich stets bei der Verwirklichung meiner eigenen Ziele unterstützt haben.